SYNTHESE DER GLUCURONSÄUREDERIVATE VON 2-PHENYL-PROPAN-1-OL, 2-PHENYL-PROPAN-2-OL UND PENTAZOCIN UND BESTIMMUNG IHRER HYDROLYSERATEN BEI DER SPALTUNG MIT SALZSÄURE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
MICHAEL LANGER
aus
KÖLN

BONN 1985

SYNTHESE DER GLUCURONSÄUREDERIVATE VON 2-PHENYL-PROPAN-1-OL, 2-PHENYL-PROPAN-2-OL UND PENTAZOCIN UND BESTIMMUNG IHRER HYDROLYSERATEN BEI DER SPALTUNG MIT SALZSÄURE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem. -Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

MICHAEL LANGER

aus

KÖLN

BONN 1985

Diese Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn im Institut für Rechtsmedizin und am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Referent : Prof. Dr. S. Goenechea
Korreferent: Prof. Dr. G. Rücker

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.1985

Druck: Rheinische Fiedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung und Problemstellung	4
2	Allgemeiner Teil	12
2.1	Synthese und Darstellungsmöglichkeiten für Glucuronide	12
2.1.1	Kondensation von Aglyka mit nach Koenigs-Knorr derivatisierter Glucuronsäure	12
2.1.2	Biosynthese von Glucuroniden	16
2.2	Synthesen der Modellverbindungen	18
2.2.1	Darstellung von 2-Phenyl-propan-1-Glucuronid(16)	18
2.2.1.1	Schema des Syntheseweges	18
2.2.1.2	Anwendung unterschiedlicher Kondensationsbedingungen bei der Synthese von 13	20
2.2.1.3	Abspaltung der Schutzgruppen von 13	23
2.2.1.4	Isolierung und Reinigung von 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)	29
2.2.2	Isolierung von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)	31
2.2.2.1	Versuche zur chemischen Synthese von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)	31
2.2.2.2	Darstellung von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) durch Metabolisierung an Mäusen	36
2.2.2.3	Anreicherung von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) aus Mäuseurin	39
2.2.3	Darstellung von Pentazocin-glucuronid(6)	41
2.3	Analytik der Glucuronide	45
2.3.1	Dünnschichtchromatographie(DC)	45
2.3.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie(HPLC)	47

Seite

2.3.3	Anwendung spektroskopischer Methoden zur Charakterisierung der Glucuronide	50
2.3.3.1	Charakterisierung von 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)	50
2.3.3.2	Charakterisierung von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)	58
2.3.3.3	Charakterisierung von Pentazocin-glucuronid(6)	66
2.4	Spaltung von β-D-Glucuroniden mit Salzsäure	71
2.4.1	Allgemeine Bemerkungen zur Spaltung von β-D-Glucuroniden mit Salzsäure	71
2.4.2	Hydrolyse von 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)	74
2.4.3	Hydrolyse von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22a)	78
2.4.4	Hydrolyse von Pentazocin-glucuronid(6)	86
3	Diskussion der Ergebnisse	95
4	Experimenteller Teil	111
4.1	Angaben zu den verwendeten Geräten und Chemikalien	111
4.1.1	Zur Messung verwendete Geräte	111
4.1.2	Verwendete Chemikalien	116
4.2	Synthesevorschriften	119
4.2.1	Substanzen nach Literaturvorschriften	119
4.2.2	Synthese von 2-Phenyl-propan-1-β-D-(2,3,4-tri-O-acetyl-glucopyranuronsäuremethylester) (13)	120
4.2.3	2-Phenyl-propan-1-β-D-glucopyranuronsäure(16)	122
4.2.4	Versuchsanordnung für die Biosynthese von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) durch Mäuse	123
4.2.5	Anreicherung von 2-Phenyl-propan-2-β-D-glucopyranuronsäure(22) aus Mäuseurin	127
4.2.6	Synthese von Pentazocin-β-D-glucopyranuronsäure(6)	129
4.2.7	Darstellung von hydroxyliertem Pentazocin(30)	131

		Seite
4.3	Hydrolyseversuche zur Spaltung der synthetisierten β-D-Glucuronide	132
4.3.1	Hydrolysebedingungen	132
4.3.2	Eichungen für die quantitativen Bestimmungen	134
4.3.2.1	Quantitative Bestimmung durch HPLC	134
4.3.2.2	Gaschromatographische Bedingungen (Kapillar-GC)	136
4.3.2.3	Gaschromatographische Bedingungen zur quantitativen Bestimmung von Pentazocin(3) und "hydroxyliertem Pentazocin"(30)	142
4.3.2.4	Bedingungen zur quantitativen Bestimmung von Pentazocin(3) durch DC-Direktauswertung	144
4.3.3	Aufbereitung der Hydrolysate	146
4.3.3.1	2-Phenyl-propan-1-β-D-glucopyranuronsäure(16)	146
4.3.3.2	2-Phenyl-propan-2-β-D-glucopyranuronsäure(22)	147
4.3.3.3	Pentazocin-β-D-glucopyranuronsäure(6)	147
4.3.4	Fehlerrechnung und Ergebnisse	148
4.3.4.1	2-Phenyl-propan-1-ol(1)	148
4.3.4.2	2-Phenyl-propan-2-ol(2) und 2-Phenyl-propen(21)	149
4.3.4.3	Pentazocin(3) und hydroxyliertes Pentazocin(30)	150
4.4	Bestimmung der Halbwertszeit der β- Glucuronidasespaltung	157
4.5	Extraktionsraten der Glucuronide 16 und 6	161
4.6	Mathematische Formeln	163
5	Zusammenfassung	166

1 Einleitung und Problemstellung

Bei der Metabolisierung von körperfremden Stoffen im menschlichen oder tierischen Organismus unterscheidet man zwei Vorgänge. In der Phase-I-Reaktion werden durch Monooxygenasen, Reduktasen oder Hydrolasen katalysierte chemische Veränderungen an der Grundstruktur des Fremdstoffes durchgeführt, so daß im allgemeinen die Lipophilie gesenkt und das Molekül funktionalisiert wird. In der Phase-II-Reaktion werden Konjugate von Fremdstoffen und deren Metaboliten mit hydrophoben Resten gebildet[1),2)].

Die für den Menschen nachgewiesenen Konjugationsreaktionen sind die Glucuronidierung, Sulfatierung, Acetylierung, Glutathion-Konjugation, Glycin-Konjugation, Methylierung und die Bindung an Colamin (2-Aminoethanol). Unter den genannten Reaktionen stellt das Glucuronid das wichtigste Konjugat dar. Die Glucuronidierung erfolgt am Aglykon an funktionellen Gruppen wie -OH, -COOH, $-NH_2$, -NH, -CH und -SH[3)].

Die für die Glucuronidierung benötigte UDP-Glucuronsäure (Uridin-Diphosphat-Glucuronsäure = "aktivierte Glucuronsäure") wird im endoplasmatischen Reticulum von Lebermikrosomen aus UDP-Glucose durch Dehydrogenierung gewonnen und durch Glucuronyltransferasen auf funktionelle Gruppen der Struktur -XH übertragen.

---

1) D. Reichert; Angew. Chem., 93, 135 (1981)

2) W. Schunack, K. Mayer, M. Haake; Arzneistoffe; Friedr. Vieweg und Sohn Verlagsgesellschaft mbH; Braunschweig, Wiesbaden (1980)

3) D. Keglević; Adv. Carbohydr. Chem., 36, 57 (1979)

Für den Körper stellt die Bildung von Glucuroniden* eine Entgiftungsreaktion körperfremder Substanzen dar, die zu weniger giftigen und gut eliminierbaren Substanzen führt. Nach neueren Untersuchungen[1)] kann es aber nicht ausgeschlossen werden, daß manche Glucuronide Transportformen von carcinogenen, mutagenen oder toxischen Verbindungen darstellen.

Körperfremde Substanzen, die als Glucuronide ausgeschieden werden, sind wegen ihrer guten Wasserlöslichkeit einem chemischen Nachweis schwer zugänglich. Dieser Tatsache wird zum Beispiel in der forensischen Analytik, in der Arbeitsmedizin bei der Überprüfung der Umweltbelastung am Arbeitsplatz oder bei Biotransformationsstudien Rechnung getragen.

In der forensischen Analytik hat es sich wegen der Vielzahl an Pharmaka bewährt, allgemeine Screening-Untersuchungen durchzuführen, wobei hauptsächlich Urin als Untersuchungsmaterial verwendet wird. Dieser wird nach der allgemeinen Praxis bei verschiedenen pH-Werten mit organischen Lösungsmitteln ausgeschüttelt, womit freie, nicht konjugierte körperfremde Substanzen extrahiert werden sollen. Die konjugierten Verbindungen müssen erst von den sehr hydrophilen körpereigenen Molekülteilen, das heißt von dem Glucuronsäurerest, befreit werden, damit die Aglyka mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden können. Die Spaltung der Konjugate erfolgt meistens mit Mineralsäuren. Dabei werden von Labor zu Labor unterschiedliche Hydrolysebedingungen angewendet, die mit

---

* Bei den Substanzbezeichnungen wurde anstelle von "β-D-glucopyranuronsäure" die Kurzform "glucuronid" benutzt.

verschiedenen Fehlermöglichkeiten behaftet sind. So ist zum Beispiel bei zu niedriger Säurekonzentration oder zu kurzer Hydrolysedauer damit zu rechnen, daß die Glucuronide nicht quantitativ gespalten werden, oder daß bei zu starken Hydrolysebedingungen Artefakte der Aglyka entstehen, die nicht nachgewiesen werden oder nicht mehr nachgewiesen werden können. Weitere Fehlerquellen könnten sich daraus ergeben, daß Glucuronide, wie die Arbeit von S. L. Kanter und Mitarb.[4] am Beispiel von Cannabismetaboliten zeigt, vollständig oder zum Teil extrahierbar sind, denn solche Moleküle sind mit den allgemein üblichen Verfahren (DC, GC, GC/MS) nicht erfaßbar, wenn man nicht gezielt auf die Konjugate untersucht. Insgesamt kann gesagt werden, daß die bei der Spaltung von Arzneimittelkonjugaten erhaltenen Ergebnisse, sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht mit großer Vorsicht zu bewerten sind.

Von der Möglichkeit Glucuronide enzymatisch mit β-Glucuronidase[5] zu spalten, wird in der forensischen Analytik wegen des hohen Zeitbedarfs nur selten Gebrauch gemacht. Auch ist hierbei schwer abzuschätzen, welche Bedingungen optimal für die zu untersuchenden Substanzen sind, wie Temperatur, Zeit und pH-Wert. Ein weiterer Unsicherheitsfaktor ist die Substratspezifität der verwendeten Glucuronidase. Es ist zwar nachgewiesen worden, daß verschiedene β-Glucuronidasen fähig sind, eine große Zahl von ß-Glucuroniden zu spalten, aber es ist nicht auszuschließen, daß

---

4) S. L. Kanter, L. E. Hollister, M. Williams; J. Chromatogr., 234, 255 (1982)

5) H. U. Bergmeyer; Methoden der enzymatischen Analyse; Verlag Chemie, Weinheim Bergstraße, 869 (1962)

eine Reihe von Glucuroniden existieren, die nicht oder nur sehr langsam hydrolysierbar sind. Auch sind im Urin und anderen Gewebeflüssigkeiten Enzyminhibitoren nachgewiesen worden, die vor der β-Glucuronidasezugabe zerstört werden sollten. Der entscheidende Vorteil der β-Glucuronidasespaltung liegt darin, daß man in nur geringem Maße mit Artefaktbildung zu rechnen braucht, und somit die qualitativen Ergebnisse verwerten kann.

Zur Untersuchung der besten Reaktionsbedingungen für die hydrolytische Spaltung von β-Glucuroniden wurden bereits eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt[6 - 10].

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, festzustellen, ob bei der Glucuronidspaltung mit Mineralsäuren ein Zusammenhang zwischen der Struktur des Aglykons und der hydrolytischen Spaltbarkeit des Glucuronides besteht. Außerdem sollte festgestellt werden, welche der in der forensischen Analytik empfohlenen Hydrolysebedingungen am besten für die Glucuronidspaltung geeignet ist. Ferner sollte der Einfluß der Salzsäurekonzentration bei konstanter Hydrolysedauer auf die Wiederfindungsraten und Artefaktbildung der Aglyka untersucht werden.

---

6) S. Goenechea, K. Kobbe, K.-J. Goebel; Arzneim. Forsch. (Drug Res.), 28, 1070 (1978)

7) S. Goenechea, K.-J. Goebel; Beitr. gerichtl. Med., 36, 503 (1978)

8) S. Goenechea, K. Kobbe, K.-J. Goebel; Z. Rechtsmed., 83, 77 (1979)

9) S. Goenechea, K. Kobbe, K.-J. Goebel; Z. Rechtsmed., 85, 41 (1980)

10) S. Goenechea, W. Wessling, K.-J. Goebel; Fresenius Z. Anal. Chem., 315, 359 (1983)

Es hydrolysieren zum Beispiel R. Bonnichsen und Mitarb.[11] Glucuronide mit 3 % HCl, G. Kamm und Mitarb.[12] mit 5 % HCl, S. Goenechea und Mitarb.[6-10] mit 12.5 % HCl und M. Geldmacher v. Mallinckrodt und Mitarb.[13] und H. W. Schütz und Mitarb.[14] mit 20 % HCl.

Als Modellverbindungen sollten die Glucuronide der Cumolmetaboliten 2-Phenyl-propan-1-ol(1) und 2-Phenyl-propan-2-ol(2) sowie von Pentazocin(3)* dargestellt werden. Anschließend sollte das Verhalten der Glucuronide bei der hydrolytischen Spaltung mit Salzsäure untersucht werden.

---

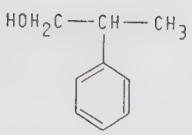
* Internationaler Freiname für 1,2,3,4,5,6-Hexahydro-8-hydroxy-6,11-dimethyl-3-(3-methylbut-2-enyl)-2,6-methano-3-benzazocin Handelspräparat: Fortral® der Firma Winthrop GmbH, Neu Isenburg. Für die Bereitstellung von Pentazocin-Base zu Synthesezwecken möchte ich mich bei Herrn Dr. E. Wehrschütz der Firma Winthrop bedanken.

11) R. Bonnichsen, Y. Marde, R. Ryhage; Clin. Chem., 20, 230 (1974)

12) G. Kamm, R. Kelm; Arzneim. Forsch. (Drug Res.), 19, 1659 (1969)

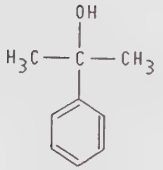
13) M. Geldmacher v. Mallinckrodt, U. Mang; Z. klin. chem. klin. biochem., 8, 259 (1970)

14) H. W. Schütz; Beitr. gerichtl. Med., 28, 354 (1971)



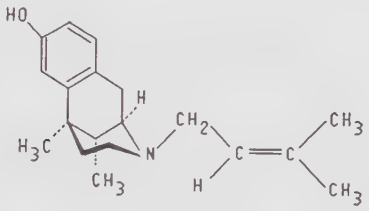
1

2-Phenyl-propan-1-ol, 1



2

2-Phenyl-propan-2-ol, 2



3

Pentazocin, 3

Bei Cumol(4) handelt es sich um einen Arbeitsstoff der chemischen Industie, der hauptsächlich für die Hook'sche Phenolsynthese verwendet wird. D. Robinson und Mitarb.[15] konnten durch ihre Untersuchungen an Kaninchen zeigen, daß 4 ausschließlich durch Oxidation der Seitenkette metabolisiert wird. Sie haben drei Hauptmetabolite beschrieben, die mit Glucuronsäure konjugiert ausgeschieden werden (Abb.: 1). Eine Hydroxylierung des Aromaten wurde nicht beobachtet.

---

15) D. Robinson, J. N. Smith, R. T. Williams; Biochem. J., 59, 153 (1955)

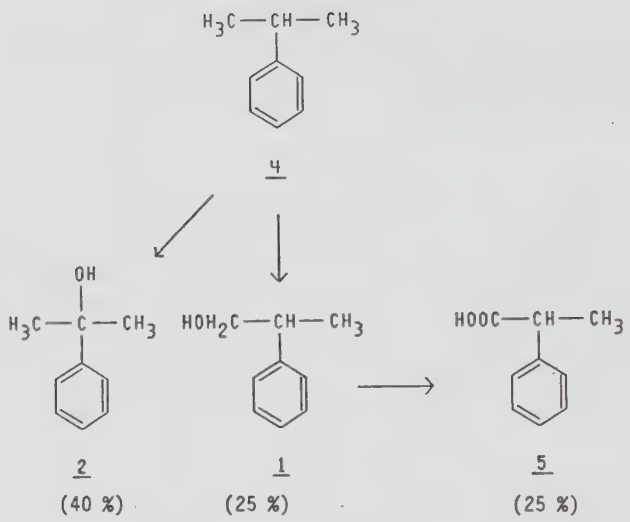


Abb. 1: Metabolismus von Cumol(4) (Kaninchen)

Der Cumolmetabolismus des Menschen wurde von W. Senczuk und B. Litewka[16] untersucht. Die Probanden nahmen über die Atemluft 8 h lang definierte Mengen Cumol(4) auf. Die erhaltenen Urinproben wurden auf pH 2 eingestellt und 15 min im siedenden Wasserbad hydrolysiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß 35 % der eingeatmeten Cumolmenge als 2-Phenyl-propan-2-glucuronid ausgeschieden werden, und daß eine direkte Korrelation zwischen Edukt und Produkt besteht.

Pentazocin(3) wird als Analgetikum mit morphinähnlichen Wirkungen eingesetzt. Die Metabolisierung erfolgt durch Oxidation der Dimethylallyl-Seitenkette, wobei ca. 12 % Z- (3a) und über den

---

16) W. Senczuk, B. Litewka; British Journal of Industrial Medicine, 33, 100 (1976)

nicht nachweisbaren E- (3b) Alkohol ca. 39 % der E- (3c) Säure gebildet werden, die konjugiert oder frei ausgeschieden werden. Außerdem wird Pentazocin(3) durch Glucuronidierung der phenolischen OH-Gruppe metabolisiert. Abbildung 2 zeigt die Metabolisierung von Pentazocin(3) im Menschen[17].

Pentazocin(3) wird nach Metabolisierung hauptsächlich mit dem Urin ausgeschieden, der Anteil in den Faeces ist mit 3 bis 5 % gering[18].

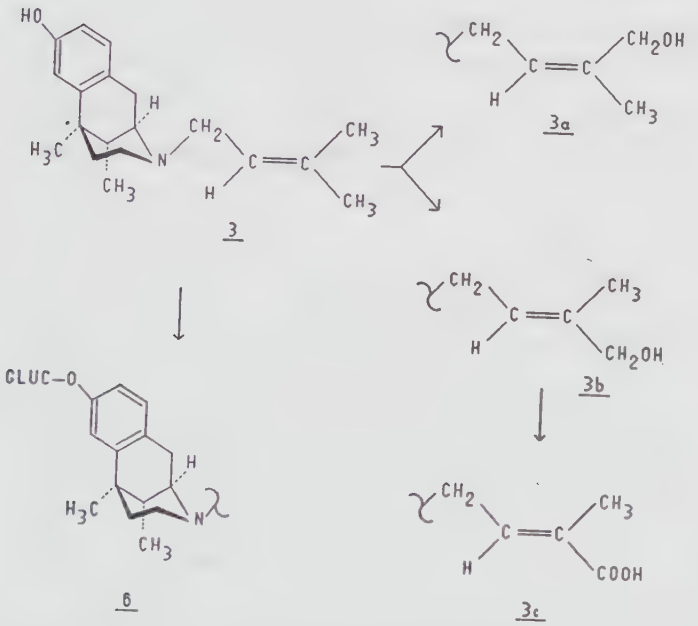


Abb. 2: Metabolismus von Pentazocin(3) im Menschen

---

17) S. Pfeifer; Biotransformation von Arzneimitteln; Verlag Chemie, Weinheim, New York Bd. 2, 278 (1977)

18) K. H. Beyer; Biotransformation der Arzneimittel; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 254 (1975)

2. Allgemeiner Teil

2.1 Synthese und Darstellungsmöglichkeiten für Glucuronide

2.1.1 Kondensation von Aglyka mit nach Koenigs-Knorr derivatisierter Glucuronsäure

Die Synthese von β-D-Glucuroniden wird in der Regel in zwei Schritten durchgeführt: Kondensation des Aglykons mit derivatisierter Glucuronsäure (Williamson'sche Ethersynthese), Abspaltung der Schutzgruppen und Isolierung des Glucuronides. Die wichtigste Synthese für die Bildung von Aglykon-Glucuronid - Bindungen ist die Koenigs-Knorr - Reaktion[19, 19a)], bei der Phenole oder aliphatische Alkohole mit 1-Halogen-glucuronsäurederivaten in Gegenwart von Kondensationsmitteln reagieren. Bei dieser Reaktion können drei Faktoren variiert werden:

- Lösungsmittel
- Kondensationsmittel
- Glucuronsäurederivat

In Tabelle 1 ist eine Zusammenstellung der in der Literatur häufig verwandten, erfolgreichen Synthesemöglichkeiten aufgeführt.

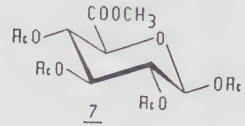
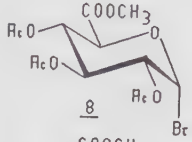
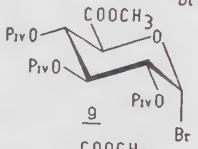
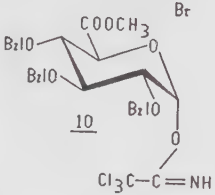
---

19) W. Koenigs, E. Knorr; Chem. Ber., 34, 957 (1901)

19a) E. Schaumann; Schutzgruppen der alkoholischen Hydroxy-Funktion; In: H. J. Houben, T. Weyl; Methoden der organischen Chemie, Bd. VI 1/b (Alkohole III), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 4. Aufl., S. 755 (1984)

Tab. 1: Verschiedene Reaktionsbedingungen zur Synthese von β-Glucuroniden

Bemerkung: Die Literaturstelle gibt den Zusammenhang wieder (Lit. folgende Seite)

Lösungsmittel	Lit.	Kondensationsmittel	Lit.	Glucuronsäurederivat	Lit.
Schmelze des Aglykons	20, 21, 30, 31	Silbercarbonat	20, 23, 31	 7	20, 25, 26 29, 30, 32
Benzol	20, 23, 28	Silberoxid	22		
Toluol	24, 27, 28	p-Toluolsulfonsäure	20, 26, 30		
Benzol-Nitromethan	29	Cadmiumcarbonat	24, 27, 28	 8	20, 21, 22 23, 24, 27 28, 32
Dichlormethan	33	Zinkchlorid; Chinolin	20		
1,2-Dichlorethan	25, 31	Zinn(IV)-chlorid	25		
Nitromethan	21	Quecksilbercyanid	21, 24, 29	 9	31
Acetonitril	22, 30	Bortrifluorid-Etherat	26, 33		
Essigsäure/Essigsäureanhydrid	20	CdS; CdO; $ZnCO_3$; HgO-$HgBr_2$	24	 10	33
Natronlauge/Aceton	23	NBu_4HSO_4	32		
Natronlauge/ Dichlormethan	32				

Ac = $-CO-CH_3$; Piv = $-CO-C(CH_3)$; Bzl = -CO-Phenyl

G. N. Bollenback und Mitarb.[20] beschreiben die Möglichkeit der Umsetzung von Natriumphenolat mit Acetylbromglucuronsäuremethylester in absol. Ethanol. R. Petersen und Mitarb.[34] haben Glucuronide über eine Glucosid-Synthese mit Acetobromglucose und

---

20) G. N. Bollenback, J. W. Long, D. G. Benjamin, J. A. Lindquist; J. Am. Chem. Soc., 77, 3310 (1955)

21) B. Helferich, A. Berger; Chem. Ber., 90, 2492 (1957)

22) K. Kato, K. Yoshida, H. Tsukamoto, M. Nobunaga, T. Masuya, T. Sawada; Chem. Pharm. Bull., 8, 239 (1960)

23) H. Yoshimura, K. Oguri, H. Tsukamoto; Chem. Pharm. Bull., 16, 2114 (1968)

24) R. B. Conrow, S. Bernstein; J. org. Chem., 36, 863 (1971)

25) K. Honma, K. Nakazima, T. Uematsu, A. Hamada; Chem. Pharm. Bull., 24, 394 (1976)

26) B. Yagen, S. Levy, R. Mechoulam, Z. Ben Zvi; J. Am. Chem. Soc., 99, 6444 (1977)

27) K. Watanabe, K. Oguri, H. Yoshimura; Chem. Pharm. Bull., 27, 3009 (1979)

28) J. Goto, K. Suzaki, T. Nambara; Chem. Pharm. Bull., 28, 1258 (1980)

29) U. Zehavi, R. Mechoulam; Carbohydr. Res., 98, 143 (1981)

30) D. Rothley, H. Oelschläger; Arch. Pharm., 315, 457 (1982)

31) J. Vlahov, G. Snatzke; Liebigs Ann. Chem., 1983, 570

32) E. V. Dehmlow, S. S. Dehmlow; Phase Transfer Catalysis, 2. rev. ed., Verlag Chemie, Weinheim (1983)

33) R. R. Schmidt, G. Grundler; Synthesis, 1981(11), 885

34) R. Petersen, H. Flasch, N. Heinz; Arzneim. Forsch. (Drug Res.), 27, 642 (1977)

nachfolgende schonende Glucose-Oxidation mit Sauerstoff in Gegenwart von Platin dargestellt. Darstellungen von Esterglucuroniden gelangen H. Tsukamoto[35] und D. Rothley und Mitarb.[30] mit dem Silbersalz der zu kondensierenden Säure und Acetylbromglucuronsäuremethylester in Acetonitril.

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt durch Hydrolyse in Methanol oder Aceton mit Natriummethylat, Bariummethylat, ammoniakalischer Methanollösung oder Natronlauge. Zur Abtrennung von Verunreinigungen wird das Glucuronid als schwerlösliches Salz (meist als Bariumsalz) gefällt und nach Zentrifugieren durch Zugabe von Säuren (Schwefel- oder Oxalsäure) freigesetzt. Nach Filtration werden die Glucuronide aus Wasser, Methanol, Ethanol, Ether, Essigsäureethylester, Aceton oder Gemischen daraus auskristallisiert oder gefällt. Erhalten wurden Produkte, die Natrium enthielten oder frei von Natrium waren mit unterschiedlichen Gehalten an Wasser (0.5 bis 3 Mol). B. Helferich und Mitarb.[21] hydrolisierten mit ammoniakalischer Methanollösung und isolierten das Amid des Glucuronides. H. Yoshimura und Mitarb.[23] isolierten Glucuronide, die einen basischen Stickstoff enthalten mit Ionenaustauscherharz (H^+- Form) aus wäßrigem Milieu und eluierten sie mit Ammoniaklösung vom Austauscherharz.

---

35) H. Tsukamoto, K. Kato, K. Yoshida; Chem. Pharm. Bull., 12, 731 (1964)

2.1.2 Biosynthese von Glucuroniden

Die am häufigsten genutzte biosynthetische Darstellungsmethode für Glucuronide ist der Tierversuch, bei dem den Tieren Aglyka verabreicht werden. Die Isolierung der Glucuronide erfolgt meist aus dem Urin, selten aus den Faeces. C. Fenselau und Mitarb.[36] beschreiben die Umsetzung von Aglyka mit frisch isolierter UDP-Glucuronyltransferase, die in Agarose fixiert ist, während B. Yagen und Mitarb.[26] die enzymatische Glucuronidierung in Lösung beschreiben.

Für die Isolierung von Glucuroniden aus dem Urin werden in der Literatur unterschiedliche Arbeitstechniken angegeben:

- Adsorption der Glucuronide an Aktivkohle und Extraktion der Aktivkohle mit Essigsäure [37],[38]
- Extraktion des Urins mit Butanol
  Nach Einengen des Extraktes wird das Butanol-Konzentrat auf eine mit Aluminiumoxid gefüllte Säule gegeben, zunächst mit Butanol und steigenden Anteilen Wasser (2 %, 5 %, 10 %) eluiert, um Begleitstoffe abzutrennen, und anschließend mit Butanol/verd. Natronlauge eluiert[39].

---

36) C. Fenselau, S. Pallante,I. Parikh; J. Med. Chem., 19, 679 (1976)

37) K. Oguri, S. Ida, H. Yoshimura, H. Tsukamoto; Chem. Pharm. Bull., 18, 2414 (1970)

38) H. Yoshimura, M.-A. Mori, K. Oguri; Chem. Pharm. Bull., 18, 2548 (1970)

39) U. Baumann; Fresenius Z. analyt. Chem., 166, 78 (1959)

- Perforation mit Ether[4,15] oder Essigsäureethylester[40]
- Fällung als Bleisalz und Freisetzung mit Schwefelwasserstoff aus wäßriger oder methanolischer Lösung[35]
- Extraktion von Glucuroniden mit Reversed Phase - Extraktionssäulen wie Bond Elut®, Sep Pak® oder XAD® [4],[28],[41].
- Derivatisierung durch Methylierung (mit Nitromethan) und Acetylierung (Essigsäureanhydrid/ Pyridin)[26],[30]
- Derivatisierung durch Methylierung und Silylierung [29],[42]

---

40) H. Tsukamoto, H. Yoshimura, K. Tatsumi; Chem. Pharm. Bull., 11, 421 (1963)

41) J. D. White, D. P. Schwartz; J. Chromatogr., 196, 303 (1980)

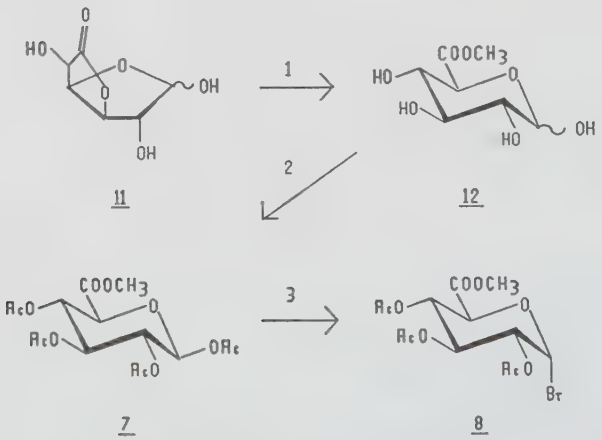
42) F. Marcucci, R. Bianchi, L. Airoldi, M. Salmona, R. Fanelli, C. Chiabrando, A. Frigerio, E. Mussini, S. Garattini; J. Chromatogr., 107, 285 (1975)

2.2 Synthesen der Modellverbindungen

2.2.1 Darstellung von 2-Phenyl-propan-1-Glucuronid(16)

2.2.1.1 Schema des Syntheseweges

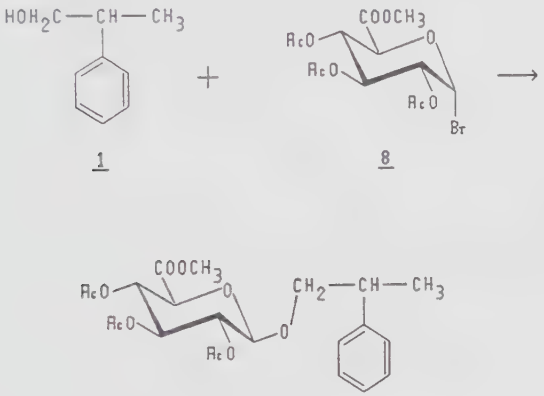
Die Synthese des Acetobromglucuronsäuremethylesters(8) gelang mit guten Ausbeuten nach der von G. N. Bollenback[20] beschriebenen Methode. Ausgehend von dem Glucuronsäure-γ-lacton(11) erfolgte die Derivatisierung durch Methylierung der Carboxylgruppe nach Lactonringöffnung mit katalytischen Mengen Natriummethylat (12), die Acetylierung der freien OH-Gruppen mit Essigsäureanhydrid in Pyridin (7) und die stereospezifische Bromierung des glykosidischen Kohlenstoffs mit Bromwasserstoff, der in Eisessig gelöst ist (8) (Abb. 3).



11 12 7 8

Abb. 3: Darstellung von 1-Brom-1-desoxy-α-D-2,3,4-tri-O-acetyl glucopyranuronsäuremethylester(8) nach G. N. Bollenback[20] (1: $NaOCH_3$/MeOH; 2: Ac_2O/Pyridin; 3: HBr/Eisessig)

Bei der anschließenden Kondensation von 1 und 8 wurden die besten Ausbeuten (ca. 50 %) an 13 durch Verwendung des von M. Fetizon[43] beschriebenen Ag_2CO_3/Celite® als Kondensationsmittel erreicht (Abb. 4)* . Für die Synthese wurde das Racemat von 1 verwendet.



1 8 13

Abb. 4: Darstellung von 2-Phenyl-propan-1-O-ß-D-(2,3,4-tri-O acetyl-glucopyranuronsäuremethylester) (13)

Nach vollständiger Hydrolyse der Estergruppen mit überschüssiger Natronlauge konnte das erhaltene Natriumglucuronat (14) durch Zusatz von basischem Bleiacetat quantitativ als Bleiglucuronat (15) gefällt werden. Der erhaltene Niederschlag von 15 wurde durch Waschen mit Wasser/Ethanol (1+1) gereinigt.

---

* DC-Reaktionskontrolle: Flm. 1, Sprühm. 1 (vgl. Kap. 4.1.1)

43) M. Fetizon, M. Golfier; Compt. rend., 267, 900 (1968)

Anschließend erhielt man durch Einleiten von H_2S[44] in eine methanolische Aufschlämmung von 15 das methanollösliche freie Glucuronid 16 und das methanolunlösliche PbS (Abb. 5)* .

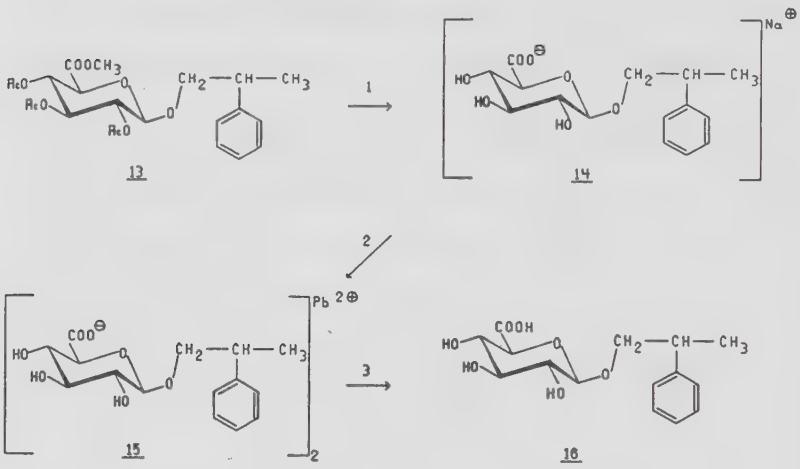


Abb. 5: Darstellung von 2-Phenyl-propan-1-ß-D-glucopyranuronsäure(16) (1: 4 N-NaOH/Aceton; 2: $Pb(OAc)_2$; 3: H_2S/Methanol)

2.2.1.2 Anwendung unterschiedlicher Kondensationsbedingungen bei der Synthese von 13

Die nach G. N. Bollenback[20] ausgeführte Synthese von 1-Brom-1-desoxy-α-D-2,3,4-tri-O-acetyl-glucopyranuronsäuremethylester (8) gelang mit guten Ausbeuten. Die Beobachtung von W. D. S.

---

* DC- und HPLC-Bedingungen vgl. Kap. 2.3.1, 2.3.2, 4.1.1

44) G. Jander, E. Blasius; Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie; S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 10. Aufl. 1973

Bowering[45], daß sich 8 innerhalb eines Tages bei Raumtemperatur zersetzt, bestätigte sich. Ein weiterer Hinweis für die Instabilität von 8 ist, daß sich eine Lösung in Toluol nicht ohne vollständige Zersetzung im Vakuum zur Trockne einengen läßt. Daher wurde die von A. Taurog[46] vorgeschlagene Stabilisierung durch Lösen in Eisessig und Eingießen dieses Gemisches in Eiswasser nachvollzogen. Das dabei erhaltene weiße, amorphe Pulver hatte jedoch den Nachteil, daß in ihm erhebliche Mengen an Wasser und Essigsäure enthalten waren, die nicht ohne Zersetzung des Produktes vollständig entfernt werden konnten. Bei Verwendung des feuchten Pulvers erhielt man beim Lösen in Toluol eine Toluol/Wasser - Emulsion, die zwar durch Zugabe von Na_2SO_4 gebrochen werden konnte, aber keine vollständige Entfernung des Wassers und der Essigsäure gewährleistete. Daher wurde auf eine Stabilisierung von 8 nach A. Taurog[46] verzichtet.

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen wurde festgestellt, daß 8 in Chloroform gelöst unter Stickstoffatmosphäre bei -18°C über mehrere Monate ohne Zersetzung haltbar war. Für große Reaktionsansätze (mehr als 10 g 8) wurde frisch kristallisierter Acetylbromglucuronsäuremethylester(8) verwendet.

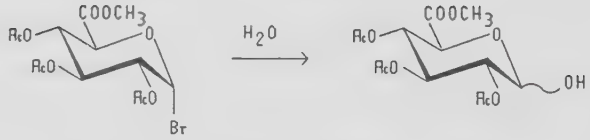
Das wesentliche Problem bei der Kondensation von 1 mit 8 besteht darin, möglichst wasserfrei zu arbeiten, da 8 mit Wasser zu 1-Hydroxy-2,3,4-tri-O-acetyl-glucopyranuron-säuremethylester

---

45) W. D. S. Bowering, T. E. Timmell; J. Am. Chem. Soc., 82, 2827 (1960)

46) A. Taurog, S. Abraham, L. C. Chaikoff; J. Am. Chem. Soc , 75, 3475 (1953)

(17) reagiert (Abb. 6) [47].



8 17

Abb. 6: Bildung von 1-Hydroxy-2,3,4-tri-O-acetyl-glucopyranuronsäuremethylester(17)

Auch bei Verwendung von wasserfreien Lösungsmitteln ist es schon auf Grund der Reaktionsgleichung (Gl. 1) nicht möglich, völlig wasserfrei zu arbeiten, da bei der Reaktion Wasser gebildet wird.

$$2\ R'\text{-}Br + 2\ R\text{-}OH + 2\ Ag_2CO_3 \longrightarrow 2\ R'\text{-}O\text{-}R + 2\ AgBr + Ag_2O + 2CO_2 + H_2O \qquad \text{(Gl. 1)}$$

Für die Entfernung dieses Reaktionswassers wurden in der Literatur entweder die Zugabe von Wasserbindemitteln wie Na_2SO_4, $CaSO_4$[48] oder zerkleinertes Molekularsieb[31], oder die azeotrope Destillation vorgeschlagen[23),24),27),28),38),49].

---

47) C. M. McCloskey, G. H. Coleman; Org. Syn., Coll. Vol., 3, 434 (1955)

48) J. S. Elce, J. G. D. Carpenter, A. E. Kellie; J. Chem. Soc. (C), 1967, 542

49) H. H. Wotiz, E. Smakula, N. N. Lichtin, J. H. Leftin; J. Am. Chem. Soc., 81, 1704 (1959)

Von den vorgeschlagenen Möglichkeiten erwies sich die azeotrope Destillation als beste Methode. An Kondensationsmitteln wurden $ZnCl_2$, p-Toluolsulfonsäure, $CdCO_3$, Ag_2CO_3 und Ag_2CO_3-Celite® nach M. Fetizon[43] verwendet. Mit $ZnCl_2$ und p-Toluolsulfonsäure konnte keine Kondensation erreicht werden. Die Ausbeute an 13 bei Verwendung von Ag_2CO_3 betrug 3 %, mit Ag_2CO_3/Na_2SO_4 5 %, mit $CdCO_3$ 10 % und mit Ag_2CO_3-Celite® 50 %.

2.2.1.3 Abspaltung der Schutzgruppen von 13

Da während der Entacetylierung Verluste auftreten können, wurde der Ablauf der Reaktion, die verschiedene Autoren[21-23,38,49] durch alkalische Hydrolyse mit katalytischen Mengen Natriummethylat durchführen, untersucht. Die Angaben zur Hydrolysedauer variieren in der Literatur von 5 Minuten Kochen unter Rückfluß[49] bis zu 2 Tagen bei Raumtemperatur[22]. Für die Abspaltung der Acetyl-Gruppen ist die Basizität des Natriummethylats ausreichend, der Methylester wird unter diesen Bedingungen nicht gespalten, so daß als Zwischenprodukt der Methylester des Glucuronides 18 auftritt, der aber nicht isoliert wurde (Abb. 7; s. S. 24).

Durch HPLC-Untersuchung* wurde festgestellt, daß nach etwa 30 Minuten ca. 80 % von 13 vollständig entacetyliert waren, die restlichen 20 % lagen als Mono- und Diacetylprodukt vor. Ein Erwärmen auf 40°C im Wasserbad führte zu keiner weiteren Entacetylierung. Erst nach Zugabe weiteren Natriummethylats wurden die Zwischenprodukte vollständig entacetyliert.

---

* HPLC-Bedingungen: Säule: Lichrosorb®-RP_{18} (125-4) (5 µm);
Flm.: Acetonitril/Methanol (1+1) 70 % / H_2O 30 %;
Detektion: UV bei 258 nm und 212 nm

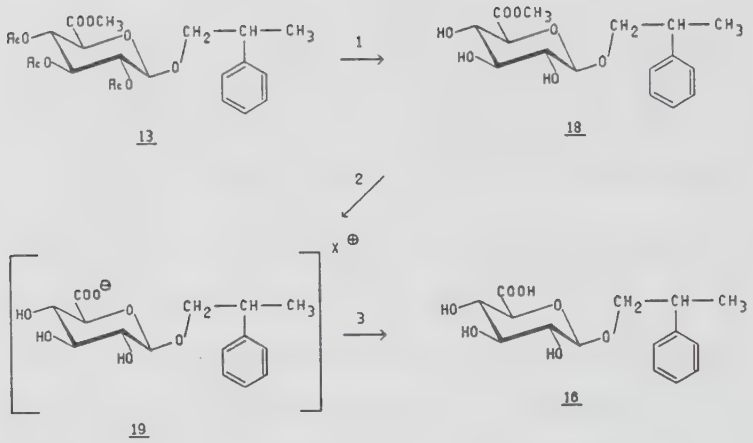


Abb. 7: Abspaltung der Schutzgruppen
(1: $NaOCH_3$/Methanol; 2: $Ba(OH)_2$; 3: H_2SO_4 bzw. Oxalsäure)

Eine Erklärung für diese Verhältnisse bieten die während der Reaktion auftretenden pH-Änderungen. Zu Beginn der Reaktion beträgt der pH-Wert der mit Natriummethylat versetzten methanolischen Lösung 13. Durch die Freisetzung der Acetylgruppen bildet sich mit Spuren Wasser ein Natriumacetat/Essigsäure - Puffer. Dabei wird der pH-Wert auf 6 bis 7 gesenkt und die Reaktion kommt zum Stillstand. Weitere Versuche zeigten, daß die Reaktion innerhalb von 1 Stunde bei Raumtemperatur vollständig ablief, solange der pH-Wert der Lösung nicht unter 11 absank.

Nach Abspaltung der Acetylgruppen mit Natriummethylat wurde der Methylester(18) mit äquimolaren Mengen kalt gesättigter $Ba(OH)_2$- Lösung versetzt. Nach Zentrifugation des ausgefallenen Bariumsalzes wurde das Glucuronid durch Zugabe von 0.1 N-H_2SO_4 freigesetzt und der Bariumsulfat-Niederschlag abfiltriert. Da sich ein Teil des Glucuronides zersetzte, wurde das Produkt dc-gereinigt*, mit Methanol eluiert, mit Ether gefällt, in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das erhaltene Produkt zeigte bei der dc-Untersuchung einen Fleck (Fluoreszenzlöschung; Anisaldehyd/H_2SO_4: schwarz; Naphthoresorcin/H_3PO_4: blau) bzw. bei der HPLC-Analyse ein Signal mit einem UV-Maximum bei 258 nm. Außerdem setzte das Produkt nach Zusatz von ß-Glucuronidase das Aglykon 1 frei. Die Elementaranalyse ergab für 16 jedoch eine starke Abweichung der gefundenen Werte von den berechneten (Tab. 2; s. S. 28). Diese sollten durch Verunreinigungen hervorgerufen werden, die weder bei der dc- noch bei der HPLC-Untersuchung detektiert wurden**. Eine chromatographische Reinigung dieses Produktes auf einer Lobar®-Säule (RP_8) (Fließmittel: MeOH/ H_2O/ HCOOH (80/40/20)) war erfolglos, da sich das Produkt zersetzte.

In einem weiteren Versuch wurde bei der Herstellung von 16 das Bariumglucuronid mit Oxalsäure statt mit Schwefelsäure freigesetzt. Durch diese Variation sollte ein möglicher Einfluß der Schwefelsäure untersucht werden. Hier wie vor den folgenden Verbrennungsanalysen wurden die Produkte dc- gereinigt*, mit Hilfe

---

* Flm. 2 (vgl. Kap. 4.1.1)

** DC- und HPLC-Bedingungen vgl. Kap. 2.3.1, 2.3.2, 4.1.1

der DC und HPLC auf Reinheit überprüft und auf Spaltbarkeit mit ß-Glucuronidase untersucht. Die Elementaranalyse (Tab. 2; s. S. 28) zeigt, daß die Art der Freisetzung (Schwefelsäure oder Oxalsäure) keinen Einfluß auf die Reinheit besitzt.

Die Vermutung, daß die Verunreinigung aus Glucuronsäure besteht (Ber.: C 37.1 ; H 5.15), die durch Hydrolyse freigesetzt wird, konnte durch Auswertung analytischer und spektroskopischer Daten nicht bestätigt werden. Außerdem müßte der Gehalt an freier Glucuronsäure bei diesen Verbrennungswerten bei über 80 % liegen. Das Produkt wurde nochmals dc- gereinigt* und zur Verbrennung gebracht, ohne daß sich die Werte besserten (Tab. 2; s. S. 28).

Es wurde nun versucht, die Substanz durch präparative HPLC zu reinigen (Fließmittel: CH_3CN/ 0.1 M-KH_2PO_4). Da sich ein Teil zersetzte, wurde dc- gereinigt*. Das gefriergetrocknete Produkt wurde der Elementaranalyse zugeführt. Das Ergebnis der Elementaranalyse (Tab. 2; s. S. 28), bei der nur 83.5 % der zur Verbrennung gebrachten Probe als C, H und O nachweisbar sind, weist auf die Möglichkeit anorganischer Bestandteile hin. In der Bunsenflamme zeigte sich, daß die Substanz Natrium enthielt. Daher wurde sie in Methanol gelöst und über eine mit Kationenaustauscherharz (H^+-Form) gefüllte Säule gegeben. Im Eluat war kein Natrium mehr nachweisbar. Da sich ein Teil der Substanz zersetzt hatte, wurde sie dc- gereinigt und nach Gefriertrocknung zur Verbrennung gebracht. Auch hier ergab sich keine Verbesserung der Analysenwerte (Tab. 2; s. S. 28).

---

* Flm. 2 (vgl. Kap. 4.1.1)

Eine quantitative Untersuchung durch Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)* ergab, daß in ihr ca. 10 % Natrium enthalten waren. Beim Vorliegen eines Natriumglucuronides dürften aber nur 6.9 % Natrium enthalten sein. Da vor jeder Verbrennungsanalyse eine dc-Reinigung durchgeführt worden ist, lag es nahe, die Verunreinigung im verwendeten Fließmittel und im Schichtmaterial der DC-Platten zu suchen. Dabei konnte durch flammenspektroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden, daß in dem Schichtmaterial der DC-Platten erhebliche Mengen Natrium enthalten sind, die durch das verwendete Fließmittel 2 (vgl. Kap. 4.1) freigesetzt werden. Als weiteres Indiz für das Vorliegen des Natriumsalzes des Glucuronides dient der in einer 1 %igen wäßrigen Lösung ermittelte pH-Wert von über 7.

Um nachzuweisen, daß die stark von der Theorie abweichenden Verbrennungsergebnisse auf den hohen Natriumgehalt zurückzuführen sind, wurden zwei Proben parallel aufgearbeitet. 13 wurde in Aceton gelöst und entweder mit 4 N-NaOH oder mit 4 N-KOH versetzt. Die erhaltenen Produkte wurden mit Ether gefällt, in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet, ohne eine dc- Reinigung durchzuführen (Tab. 2; s. S. 28).

Bei der Verwendung von KOH liegen die Gehalte an C und H bei der Elementaranalyse noch niedriger als bei der Verwendung von

---

* Ich danke Herrn Dr. H. Vogel (Chemisches- und Lebensmittel-Untersuchungsamt der Stadt Bonn) für die quantitative Bestimmung von Natrium durch AAS.

NaOH. Geht man davon aus, daß die erhaltenen Produkte gleiche Molmengen der jeweiligen Alkalimetalle enthalten, dann müssen die Differenzen zwischen den berechneten und gefundenen C- bzw. H-Anteilen gleich werden, wenn man auf die jeweilige Molmasse normiert.

Tab. 2: Vergleich der Ergebnisse der Elementaranalysen nach unterschiedlicher Aufarbeitung

Aufarbeitung		C [%]	H [%]	O [%]
	Ber.	57.7	6.45	35.9
Schwefelsäure, DC	Gef.	45.1	5.80	
Oxalsäure, DC	Gef.	45.4	5.40	
weitere dc-Reinigung	Gef.	45.8	5.33	
HPLC-Reinigung, DC	Gef.	44.5	5.55	33.5
Kationenaustauscher	Gef.	46.0	5.60	
und dc-Reinigung				
4 N-NaOH	Gef.	45.9	5.69	
4 N-KOH	Gef.	38.5	5.16	

Führt man diese Rechnung für die Kohlenstoffgehalte aus, so erhält man: $[(57.7 - 45.9)* 39.1]/[22.99 * (57.7 - 38.5)] = \underline{1.040}$

Für die Wasserstoffgehalte ergibt sich:

$[(6.45 - 5.69) * 39.1]/[22.99 * (6.45 - 5.16)] = \underline{1.002}$

Dieses Ergebnis läßt folgenden Schluß zu: Bei der Anwesenheit von Alkalikationen bildet 16 ein Produkt konstanter Zusammensetzung, das mehr als 1 Mol Kation pro Mol Glucuronid enthält. Eine Erklärung für dieses Verhalten kann nicht gegeben werden. Es ist zu bemerken, daß die von R. Petersen[34] geäußerte Vermutung, daß das von ihm synthetisierte Glucuronid durch Silikate der Kieselgelschicht verunreinigt ist, durch diese Ergebnisse widerlegt wird, da für diese Untersuchung die Produkte nicht durch DC gereinigt worden sind.

Die vorliegenden Ergebnisse machen auch deutlich, warum verschiedene Autoren die Hydrolyse mit katalytischen Mengen Natriummethylat, das heißt, mit möglichst wenig Natrium, durchführen. Von "katalytischen" Mengen kann in diesem Zusammenhang nur gesprochen werden, wenn die Abspaltung unter völligem Ausschluß von Wasser erfolgt, da sonst das zugesetzte Natriummethylat während der Reaktion verbraucht wird. Sie arbeiten lieber mit geringeren Ausbeuten und umgehen dabei das Problem zuviel zugesetztes Natrium später wieder abzutrennen, erhalten dafür aber Produkte, deren Elementaranalysen den theoretischen Werten entsprechen.

2.2.1.4 Isolierung und Reinigung von 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)

Nach den Erfahrungen mit Natriummethylat und den weiteren Aufarbeitungsschritten wurde als nächste Möglichkeit die Zugabe großer Mengen Natriumhydroxid zur Verseifung der Ester mit anschließender Abtrennung der Natriumionen genutzt.

Die Abspaltung der Acetylgruppen und der Methylgruppe gelang quantitativ mit 4 N-NaOH, die zu einer Lösung von 13 in Aceton gegeben wurde, innerhalb von 2 Stunden. Das Aceton wurde mit Stickstoff abgeblasen und die alkalische wäßrige Lösung mit Eisessig neutralisiert. Zur Fällung des Glucuronides wurde basische Bleiacetatlösung, die mit Eisessig auf pH 5 eingestellt war, verwendet. Die Fällung als Bleisalz hat gegenüber der Bariumsalzfällung den Vorteil, daß Blei mit dem CO_2 der Luft kein schwerlösliches Salz bildet. Das Bleiglucuronid wurde durch Zugabe von Ammoniak (pH 6.5 bis 7) und Ethanol aus der wäßrigen Lösung gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert. In der Bunsenflamme zeigte sich, daß in dem Niederschlag Natrium enthalten war. Durch mehrmaliges Waschen mit bidestilliertem Wasser/ Ethanol (1+1) konnte das Natrium quantitativ entfernt werden. Die Freisetzung des Glucuronides 16 gelang in methanolischer Lösung mit Schwefelwasserstoff. 16 wurde nach Abtrennung des Bleisulfidniederschlages und Einengen der methanolischen Lösung in bidestilliertem Wasser aufgenommen. Der pH-Wert einer 1 %igen wäßrigen Lösung von 16 beträgt 3. Dieser Wert entspricht der Säurestärke der Glucuronsäure. Die wäßrige Lösung wurde gefriergetrocknet.

2.2.2 Isolierung von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)

2.2.2.1 Versuche zur chemischen Synthese von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)

Bei diesen Versuchen wurden je 0.5 ml 2-Phenyl-propan-2-ol(2) in 50 ml Toluol, Benzol, Acetonitril, Chloroform, Dichlormethan oder Diethylether gelöst, mit einem Kondensationsmittel (p-Toluolsulfonsäure, Zinkchlorid, Silberoxid, Silbercarbonat, Cadmiumcarbonat oder Silbercarbonat/Celite®) versetzt und 4 Stunden unter Rückfluß gekocht. Während dieser Zeit wurden zu dieser Lösung 2 g 8, in 20 ml des entsprechenden Lösungsmittels zugetropft (Abb.:8)*.

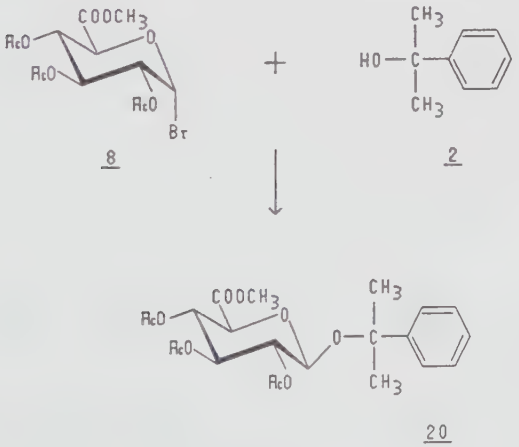


Abb. 8: Syntheseversuche zur Darstellung von 20

---

* DC-Reaktionskontrolle: Flm. 1, Sprühm. 1 (vgl. Kap. 4.1.1)

Die Versuche mit p-Toluolsulfonsäure und Zinkchlorid als Kondensationsmittel wurden nur in Toluol durchgeführt. Schon bei der Zugabe von p-Toluolsulfonsäure oder Zinkchlorid zu der Reaktionslösung kam es wegen der sauren Eigenschaften dieser beiden Kondensationsmittel zur Dehydratisierung von 2 zu 2-Phenylpropen(21). Die Versuche wurden daher nicht weitergeführt.

In Acetonitril, Chloroform, Dichlormethan und Diethylether fand keine Reaktion statt. In Toluol und Benzol wurde 2 vollständig zu 21 dehydratisiert, wobei 8 verbraucht wurde. Ohne 8 war unter gleichen Bedingungen keine Dehydratisierung feststellbar (s. S. 35).

Die folgenden Versuche zur Kondensation von 2 mit 8 wurden auf Toluol als Lösungsmittel und Silbercarbonat/Celite®[43] und Cadmiumcarbonat als Kondensationsmittel beschränkt. Die Ansätze wurden bei Temperaturen zwischen 60° und 105°C gehalten. Nach jeweils 4 Stunden wurde die Temperatur um 5°C erhöht. Bis 100°C war keine Reaktion feststellbar*, bei 105°C wurde 2 vollständig dehydratisiert, wobei 8 verbraucht wurde. Daher wurde ein Ansatz mit 2, 8, Toluol und Silbercarbonat/Celite® solange bei 100°C gehalten, bis 8 vollständig verbraucht war. Dieser Ansatz wurde über eine mit Kieselgel gefüllte Säule mit Toluol/Chloroform/Aceton aufgetrennt. Es konnte eine Substanz isoliert werden (12 mg), die auf DC-Platten mit Fluoreszenzindikator Fluoreszenslöschung zeigte und sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure schwarz anfärbte. Bei der Untersuchung des isolierten Produktes konnte kein für 2 spezifisches UV-Maximum nachgewiesen werden.

---

* DC-Reaktionskontrolle: Flm. 1, Sprühm. 1 (vgl. Kap 4.1.1)

Um sicherzustellen, daß während der gesamten Reaktionszeit 2 zur Verfügung stand, wurden 0.5 ml 2 und 2 g 8 in 20 ml Toluol gelöst und zu 50 ml kochendem Toluol mit ca. 0.5 g Silbercarbonat/Celite® zugetropft. Bei der Reaktion entstanden dieselben Reaktionsprodukte wie schon vorher beschrieben.

Eine ummantelte Glassäule (450 x 30 mm) wurde mit einer Mischung von Silbercarbonat/Celite® und getrocknetem Natriumsulfat gefüllt. Diese Versuchsanordnung wurde aus mehreren Gründen getroffen. Durch die hohe Schicht der Füllung steht für die Reaktion immer aktives Silbercarbonat zur Verfügung. Das beigemischte getrocknete Natriumsulfat soll im Fall der Reaktion das gebildete Reaktionswasser möglichst schnell binden. Außerdem war durch die dichte Packung das Material im Innern der Säule vor Licht geschützt, so daß das lichtempfindliche Silbercarbonat nicht durch Lichteinwirkung desaktiviert werden konnte. Auf diese Säule wurden 2 und 8, in Toluol gelöst, gegeben. Durch Toluolzugabe wurden 2 und 8 langsam eluiert. Das Eluat wurde wieder auf die Säule gegeben. Über den Glasmantel wurde die Säule mit Wasser temperiert (20 bis 70 °C). Es fand keine Reaktion statt.

Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von Ethern stellt die von E. V. Dehmlow beschriebene Phasentransferkatalyse dar[50 - 52].

---

50) E. V. Dehmlow; Angew. Chem., 89, 521 (1977)

51) E. V. Dehmlow; Angew. Chem., 86, 187 (1974)

52) D. Dess, H. P. Kleine, D. V. Weinberg, R. J. Kaufman , R. S. Sidhu; Synthesis 1981(11), 883

0.5 ml 2 und 100 mg Tetrabutylammoniumhydrogensulfat wurden in 30 ml Dichlormethan gelöst und mit 1 g gepulvertem Natriumhydroxid versetzt. Zu dieser Lösung wurden 2 g 8 in 10 ml Dichlormethan gegeben. Es fand keine Reaktion statt.

Ein weiterer Ansatz wurde wie oben beschrieben behandelt, nur mit 10 ml Wasser versetzt. 8 wurde quantitativ zur freien Glucuronsäure verseift, 2 blieb unverändert.

Zu 5 ml 2, wobei das Aglykon als Lösungsmittel fungiert, wurden Silbercarbonat/Celite® und festes 8 gegeben. Beim Erhitzen des Ansatzes wurde 2 dehydratisiert und 8 verbraucht.

Zu 1 ml 2 wurden 0.05 g metallisches Natrium gegeben und durch Erwärmen gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Rühren 1 g 8 in 2 ml 2 gelöst gegeben. In beiden Fällen wurden keine verwertbaren Reaktionsprodukte erhalten.

Bei der Williamson'schen Ethersynthese kann neben der Kondensation als Nebenreaktion auch eine Eliminierung ablaufen:

1. Kondensation

$$R\text{-}CH_2\text{-}OH + R'\text{-}Br \longrightarrow R\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}R' + HBr$$

2. Eliminierung

$$R\text{-}CH_2\text{-}OH + R'\text{-}Br \longrightarrow R{=}CH_2 + R'\text{-}Br + H_2O$$

Auf die Reaktion von 2 mit 8 angewandt, ergeben sich die in Abbildung 12 dargestellten Reaktionsprodukte.

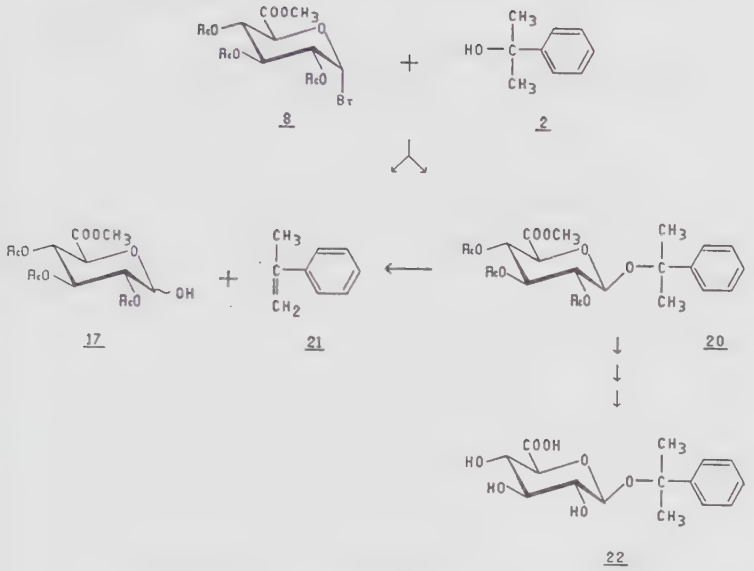


Abb. 9: Reaktionsprodukte von 2 mit 8

Die bevorzugte Reaktion ist die Elimination, da sechs gleichwertige α-H-Atome der Methylgruppen zur Verfügung stehen. Das entstehende 2-Phenyl-propen(21) ist wegen der zum Aromaten konjugierten Doppelbindung ein stabiles Produkt. Als weitere Möglichkeit kann eine säurekatalysierte Dehydratisierung angenommen werden, wobei Spuren Wasser aus der Acetobromglucuronsäure(8) Bromwasserstoff freisetzen, der dann den tertiären Alkohol dehydratisiert. Ferner hat sich 2 als thermolabile Substanz erwiesen, so daß auch eine thermische Dehydratisierung möglich ist.

Da die vielen Versuche, 22 chemisch herzustellen, zu keinen greifbaren Ergebnissen führten, wurde der Tierversuch als nächste Möglichkeit angewandt.

2.2.2.2 Darstellung von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) durch Metabolisierung an Mäusen*

a) Gabe von Cumol(4) an männliche Mäuse vom SWS-Stamm

Die Untersuchungen führte man mit einem Kollektiv von 10 männlichen Mäusen vom SWS-Stamm (Gewicht: 30 bis 42 g) durch, die in einem Umsatzkäfig gehalten wurden. Um das bei Raumtemperatur flüssige Cumol(4) über das Futter zu verabreichen, wurden Piletten gepreßt, die 1.0; 0.1; 0.01 und 0.001 % Cumol(4) im Futter (Altromin 1311) enthielten. Die Mäuse haben das Futter mit 0.001 % Cumol(4) erst nach einer Hungerzeit von 24 Stunden angenommen, während sie von den höheren Konzentrationen nicht gefressen haben. Ein HPLC-Vergleich** der erhaltenen Urine mit Nullurin ergab, daß keine zusätzliche Substanz nachgewiesen werden konnte. In einem zweiten Versuch wurde den Mäusen mit einer Schlundsonde bezogen auf das Körpergewicht 1 Gew.% einer Suspension von 0.1 ml Cumol(4) in 100 ml Wasser verabreicht, das entspricht einer Dosis von 10 mg 4 / kg Körpergewicht. Dieses Verfahren hatte jedoch zwei Nachteile. Zum einen war die Suspension inhomogen und zum anderen haben die Mäuse einen großen Teil der verabreichten Dosis wieder erbrochen. Auch bei diesem Versuch konnte keine neue Substanz nachgewiesen werden. Als nächstes wurde das Backfutter (ca. 25 g) im Käfig mit 0.05 ml Cumol(4) beträufelt. Die Mäuse

---

* Herrn Dr. F. Köhler am Institut für Humangenetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, danke ich für die Durchführung der Tierversuche.

** HPLC-Bedingungen vgl. Kap. 2.3.2, 4.1.1

putzten sich wegen des intensiven Geruchs von Cumol(4), nahmen aber nach kurzer Zeit das Futter an. Daraufhin wurde der Futterblock noch mit 1.5 ml Cumol(4) beträufelt. Der 24 Stunden-Sammelurin war trübe, rot gefärbt und enthielt eine Substanz, die im Nullurin nicht nachweisbar war. In der Nacht des dritten Versuchstages kam es bei den Mäusen zu Kannibalismus, so daß von einer weiteren Cumolgabe abgesehen wurde. Die neue Substanz konnte noch einen Tag lang im Urin nachgewiesen werden. Am sechsten Versuchstag hatten die Mäuse ein gesträubtes Fell, waren stark abgemagert und sehr klein. Eine Obduktion zeigte starke Veränderungen der Organe, die mit Cumol(4) belastet worden sind, wie Schlund, Magen, Leber, Niere und Blase. Die Organe waren hell verfärbt, entzündet und verhärtet oder geschrumpft.

b) Gabe von 2-Phenyl-propan-2-ol(2) an Mäuse

Die Versuche wurden mit 10 männlichen und 10 weiblichen Mäusen vom SWS-Stamm durchgeführt. Den männlichen Tieren wurde 3 Tage lang eine Dosis von 0.5 ml/Tag 2-Phenyl-propan-2-ol(2) in 25 g Diätfutter* durch Aufträufeln auf das Futter angeboten. Am vierten Tag war noch die Hälfte der Tagesdosis an Futter vorhanden. Die Tiere lagen apathisch, mit gesträubtem Fell und dicht zusammengedrängt im Käfig. In der Nacht zum fünften Tag kam es zu Kannibalismus. Nach der Umstellung auf Futter ohne 2-Phenyl-propan-2-ol(2) erholten sich die Tiere innerhalb von 3 Tagen. Den weiblichen Mäusen wurde 9 Tage lang eine Dosis von 0.5 ml/Tag (in 25 g Futter 1311) 2-Phenyl-propan-2-ol(2) durch Aufträufeln

*Standarddiätfutter 1311 (Fa. Altromin GmbH, Lage)

auf das Futter angeboten. Während der gesamten Zeit haben die Tiere das Futter restlos gefressen. Auf diese Weise wurden von den männlichen Tieren insgesamt 340 ml Urin und von den weiblichen Tieren 207 ml Urin erhalten, in dem eine Substanz enthalten war, die im Nullurin nicht nachweisbar war.

c) Auswertung der Tierversuche

Bei den Untersuchungen wurde festgestellt, daß sich bei Gabe von Cumol(4) oder 2-Phenyl-propan-2-ol(2) an Mäuse eine neue Substanz, die im Nullurin nicht enthalten war, nachweisen ließ. Auf der Dünnschichtplatte zeigte diese Substanz dasselbe Verhalten wie das synthetisierte 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16) (R_f-Wert; Fluoreszenzlöschung; Schwarzfärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4; Blaufärbung mit Naphthoresorcin/H_3PO_4). Beim HPLC-Vergleich des Mäusemetaboliten mit synthetisiertem 16 hatte dieser eine Retentionszeit von 2.6 min, während 16 unter gleichen Bedingungen erst nach 3.2 min von der Säule eluiert wurde. 16 konnte in keinem der untersuchten Urine nachgewiesen werden.

2.2.2.3 Anreicherung von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) aus Mäuseurin

Es wurden verschiedene Versuche unternommen 22 aus dem Mäuseurin als Reinsubstanz zu isolieren. Sie scheiterten wegen der großen Hitze- und Säurelabilität von 22, die auch D. Robinson und Mitarb.[15] beschrieben haben. Auch die Anwendung der Erfahrungen, die bei der Isolierung von 16 gemacht worden sind, führten nicht zum Erfolg. Nach der Fällung als Bariumsalz zersetzte sich 22 bei der Zugabe von Schwefelsäure oder Oxalsäure fast vollständig (ca. 80 %). Auch nach Fällung als Bleisalz zersetzte sich 22 während der Zugabe von H_2S über einen Zeitraum von 5 Stunden.

Gefriergetrockneter Mäuseurin wurde durch dc getrennt* , das Glucuronid 22 mit Methanol von der Kieselgelschicht eluiert und mit Ether/Petrolether gefällt. Nach Zentrifugation wurde der Rückstand in 1 ml Methanol gelöst und über Nacht zur Kristallisation ins Labor gestellt. Das Ergebnis war eine vollständige Zersetzung von 22. Der gefriergetrocknete Rückstand eines 24 Stunden-Sammelurins wurde in eine Extraktionshülse gegeben und im Soxleth-Extraktor mit Ether 6 Stunden extrahiert. Als Ergebnis konnte eine teilweise Zersetzung (ca. 60 %) festgestellt werden.

In einem weiteren Versuch wurde gefriergetrockneter 24 Stundensammelurin mit Ethanol extrahiert. Die ethanolische Lösung wurde filtriert, mit ammoniakalischer Methanollösung versetzt und nochmals filtriert. Nach Einengen des Extraktes im Vakuum bei 40°C auf 10 ml wurden das Glucuronid 22 und andere Harnbegleit-

*DC-Bedingungen: Flm. 2 vgl. Kap. 4.1.1

stoffe mit Ether/Petrolether gefällt und nach Zentrifugation wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen. Dieser Extrakt wurde auf eine mit Reversed-Phase-Material (RP_{18}) gefüllte Säule gegeben. Es wurde zuerst mit eiskaltem Wasser, dann mit eiskalter 0.1 M-KH_2PO_4-Lösung und steigenden Anteilen Acetonitril eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mit ammoniakalischer Methanollösung versetzt, um das KH_2PO_4 zu fällen und die Lösung zu alkalisieren. Die Fraktionen, die 22 enthielten, waren immer durch Zersetzungsprodukte von 22 verunreinigt.

Die Versuche, 22 in größeren Mengen (100 mg) als Reinsubstanz zu isolieren, wurden aufgegeben. Als Ziel einer Anreicherung wurde jetzt die Isolierung von dc und hplc- einheitlichem 22 gesetzt. Dc- und HPLC- einheitlich heißt in diesem Zusammenhang, daß neben 22 keine weiteren organischen Substanzen durch DC oder HPLC* nachweisbar sind. Da Acetale im alkalischen Milieu stabil sind, wurden alle Aufarbeitungsschritte unter alkalischen Bedingungen durchgeführt (siehe experimentellen Teil). Bei den vorher aufgeführten Anreicherungsmethoden ist immer mindestens ein Schritt enthalten, bei dem der pH-Wert im Sauren liegt und so zu einer Hydrolyse von 22 führt. Das erhaltene Produkt enthält anorganische Verunreinigungen; dies zeigt der pH-Wert einer 1 %igen wäßrigen Lösung dieses Produktes, der bei pH 7 liegt. Erhalten wurde ein Produkt 22a mit einem Gehalt von 60 bis 65 % an 22, welches dc und hplc einheitlich war.

---

* DC- und HPLC-Bedingungen vgl. Kap. 2.3.1, 2.3.2, 4.1.1

2.2.3 Darstellung von Pentazocin-glucuronid(6)

Die Synthese von 6 erfolgte zunächst in der von H. Yoshimura und Mitarb.[23] für die Synthese von Morphin-glucuronid beschriebenen Weise. Die Kondensation von 3 mit 8 gelang nur mit unzureichenden Ausbeuten von weniger als 2 %.

Eine Steigerung der Ausbeute auf 35 % ließ sich durch Verwendung des von J. Vlahov und G. Snatzke[31] beschriebenen Glucuronsäurederivates 9 erreichen. Ausgehend von 11 erfolgte Methylierung zu 12, Veresterung der freien OH-Gruppen mit Pivaloylchlorid in Pyridin/$CHCl_3$ (23) und stereospezifische Bromierung des glykosidischen Kohlenstoffs mit Bromwasserstoff, der in Eisessig gelöst ist (9) (Abb.: 10).

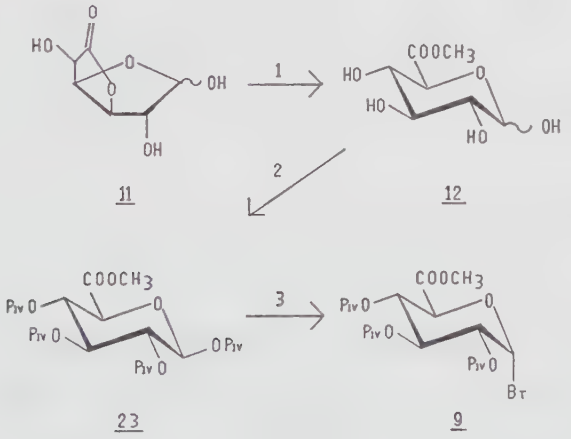


Abb. 10: Darstellung von 1-Brom-1-desoxy-α-D-2,3,4-tri-O-pivaloyl-glucopyranuronsäuremethylester(9)

(1: $NaOCH_3$/Methanol; 2: Pivaloylchlorid/Pyridin/$CHCl_3$; 3: HBr/Eisessig)

Die Kondensation von 3 mit 9 erfolgte unter gleichzeitiger Verseifung der Ester (Abb.: 11). Wegen des großen Raumbedarfs der Pivaloylgruppen sind die Esterbindungen von 9 durch alkalische Hydrolyse nicht so leicht hydrolysierbar wie die Acetylgruppen. Dies machte sich bei der dc - Überwachung* des Reaktionsverlaufes bemerkbar. Während bei der Verwendung von 8 nur das Endprodukt 6 nachweisbar war, konnte man bei Verwendung von 9 noch drei weitere Flecke identifizieren, die auf Kondensationsprodukte mit einer, zwei oder drei Pivaloylgruppen zurückzuführen sind.

Nach vollständiger Umsetzung des Glucuronsäurederivates 9 wurde der viskose Reaktionsansatz mit Wasser verdünnt und mit Essigsäure auf pH 9 eingestellt. Bei der Abtrennung des nicht umgesetzten Pentazocins(3) mit Chloroform/Isopropanol (3+1) wurde festgestellt, daß sich unter diesen Bedingungen ein Teil des gebildeten Pentazocin-glucuronides(6) in die organische Phase ausschütteln ließ. Bei anderen Reaktionsansätzen wurde daher das Aglykon durch Ausschütteln mit Dichlormethan aus der wäßrigen Phase entfernt.

Die wäßrige Phase wurde nochmals mit Wasser verdünnt und über eine mit Kationenaustauscher gefüllte Lobar®-Säule Typ B gefördert. Während alle Nebenreaktionsprodukte ungehindert über das Austauscherharz laufen, verbleibt das Produkt 6 auf der Säule. Nach Spülen mit bidestilliertem Wasser wurde 6 mit 0.15 N-NH_4OH-Lösung eluiert. Die Extraktion aus der wäßrigen Lösung gelang quantitativ mit Sep-Pak® RP_{18} - Säulen**.

---

* DC-Reaktionskontrolle: Flm. 2 und 3, Sprühm. 2+3, 4+3 (vgl. Kap. 4.1.1)

** vgl. Kap. 4.1.1

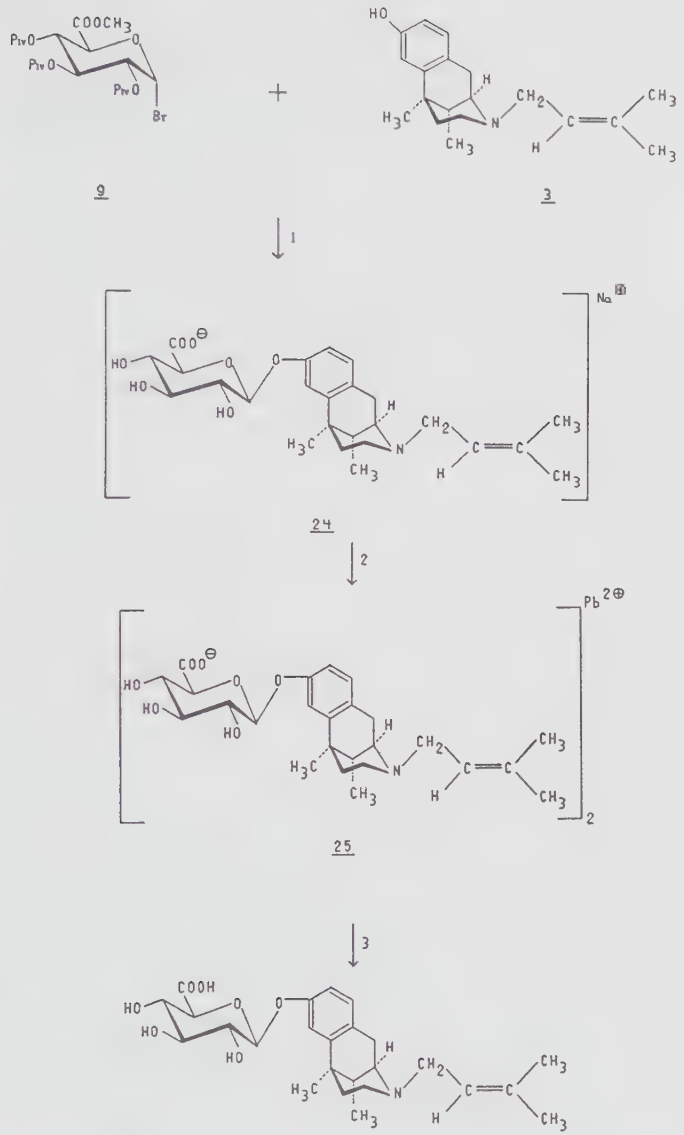


Abb. 11: Darstellung von Pentazocin-β-D-glucopyranuronsäure(6)

(1: 4 N-NaOH/Aceton; 2: $Pb(OAc)_2$; 3: H_2S/Methanol)

Da das erhaltene Produkt nach Ausfällen aus Essigsäureethylester Natrium enthielt, wurde auch mit 6 die für 16 beschriebene Bleisalzfällung und anschließende Freisetzung mit H_2S durchgeführt.

2.3 Analytik der Glucuronide

2.3.1 Dünnschichtchromatographie(DC)

Für den qualitativen Nachweis, insbesondere für die Reaktionskontrolle bei der Synthese der Glucuronide und ihre präparative Reinigung wurde die Dünnschichtchromatographie genutzt. Die R_f-Werte der drei Glucuronide 16, 22a und 6 auf Kieselgel 60 F_{254} in drei Fließmitteln [23] [53] sind in Tabelle 3 aufgeführt. Zum Vergleich sind auch die R_f-Werte der Verbindungen 26, 27 und 28 mit einbezogen*.

Tab. 3: R_f-Werte von Glucuroniden bei der dünnschichtchromatographischen Trennung
(Zusammensetzung der Fließmittel vgl. Kap. 4.1.1)

Glucuronid	R_f im Fließmittel		
	2	4	5
Phenol-glucuronid (26)	0.51	0.31	0.39
2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)	0.62	0.35	0.47
2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22a)	0.62	0.35	0.47
p-Nitrophenol-glucuronid(27)	0.55	0.30	0.38
Pentazocin-glucuronid(6)	0.47	0.10	0.10
Codein-glucuronid (28)	0.25	0.00	0.10

53) E. Stahl; Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl.; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967

* Ich danke Herrn Prof. Dr. S. Goenechea, der mir die Substanzen 26, 27, 28 und 29 (s. S. 49), die teilweise aus Vorhaben der Deutschen Forschungsgemeinschaft stammen, für Vergleichszwekke zur Verfügung gestellt hat.

Die Detektion[54] gelingt mit dem unspezifischen Sprühmittel Anisaldehyd/Schwefelsäure (Schwarzfärbung nach Erhitzen im Trokkenschrank auf 105 °C für 10 min) und mit dem für Glucuronsäurederivate gebräuchlichen Sprühmittel Naphthoresorcin/Phosphorsäure (Blaufärbung nach Erhitzen im Trockenschrank auf 105 °C für 10 min). Pentazocin(3), das Aglykon des Glucuronids 6, konnte durch aufeinanderfolgendes Besprühen mit Dragendorffs-Reagenz und Eisen(III)-chlorid in 0.1 N-HCl (rostrot) und mit Kaliumiodplatinat und Eisen(III)-chlorid in 0.1 N-HCl (violett) nachgewiesen werden. Da alle sechs Glucuronide ein aromatisches System besitzen, konnte die Fluoreszenzlöschung auf DC-Platten mit Fluoreszenzindikator bei 254 nm als weitere Identifizierungsmöglichkeit genutzt werden. Nach Auftüpfeln von konz. Salzsäure auf den Startfleck des Glucuronides 6, 10 min Erhitzen auf 60 bis 70 °C und anschließender dc - Trennung im Fließmittel 3 läßt sich das hydrolytisch freigesetzte Aglykon Pentazocin(3) nachweisen. Jedoch läßt sich unter diesen Bedingungen das später identifizierte Artefakt "hydroxiliertes Pentazocin(30)" nicht vom Aglykon 3 differenzieren. Bei 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16) und 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) gelingt dieser Nachweis wegen der Flüchtigkeit der Aglyka nicht.

---

54) Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie; E. Merck, Darmstadt 1970

2.3.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie(HPLC)

Die HPLC-Untersuchungen wurden zur Reinheitskontrolle der synthetisierten bzw. isolierten Glucuronide, zur Identifizierung von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) in Mäuseurin, zum Vergleich von synthetisiertem Pentazocin-glucuronid(6) mit dem natürlichen Pentazocin-glucuronid einer Urinprobe (Arzneimittelmißbrauch) und zur Ermittlung der Halbwertszeit der β-Glucuronidasespaltung herangezogen.

Für die Identifizierung von Glucuroniden durch HPLC wurden Reversed-Phase - Säulen (Lichrosorb®-RP_{18}; Octadecylsilica) verwendet. Das Fließmittel setzte sich je nach Polarität des Glucuronides aus Acetonitril/Methanol (1+1) und 0.1 oder 0.2 M-KH_2PO_4-Lösung zusammen. Das Gemisch aus Acetonitril/Methanol (1+1) und Wasser hatte gegenüber den von anderen Autoren[55-58] verwendeten Methanol/Wasser Gemischen den Vorteil, daß es weniger viskos ist, so daß der Säulendruck bei gleicher Förderleistung niedriger ist. Bei den Glucuroniden 16, 22, 26 und 27 konnten mit Fließmitteln, die 0.1 M-KH_2PO_4 - Lösung im Fließmittel enthielten, gute Trennungen mit scharfen symmetrischen Elutionsprofilen erhalten werden. Morphin-3-glucuronid(29), Codein-glucuronid(28)

---

55) A. G. J. Voragen, H. A. Schols, J. A. De Vries, W. Pilnik; J. Chromatogr., 244, 327 (1982)

56) A. Karakaya, D. E. Carter; J. Chromatogr., 195, 431 (1980)

57) A. Hjerpe, C. A. Antonopoulos, B. Classon, B. Engfeld, M. Nurminen; J. Chromatogr., 235, 221 (1982)

58) H. Mascher, V. Nitsche, H. Schütz; J. Chromatogr., 306, 231 (1984)

und Pentazocin-glucuronid(6), die wegen des Aminstickstoffs amphoteren Charakter besitzen, benötigen Lösungen, die 0.2 M-KH_2PO_4 enthalten, um als scharfe symmetrische Zonen von der Säule eluiert zu werden. Die Detektion erfolgt in einer UV-Durchfluß-meßzelle.

Zur Identifizierung der Glucuronide wurden Messungen bei zwei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt. Die Detektionen erfolgten unspezifisch bei 212 nm und bei dem UV-Maximum der Aglyka. Die Messungen bei 212 nm waren zwar für quantitative Bestimmungen nicht gut geeignet, da sie auf der Flanke einer Absorptionsbande erfolgten, hatten aber für Aglyka mit niedrigen ϵ-Werten ($\log \epsilon < 3$) bei längeren Wellenlängen den Vorteil empfindlicher zu sein. Außerdem konnten bei 212 nm in dem verwendeten Fließmittel (pH: 5 bis 5.5) Substanzen wie Acetat (pK_a: 4.76)[59] (λ_{max} = 210 nm; ϵ = 150 (Wasser))[60] und Glucuronat (pK_a: 3.20)[61] durch Veränderungen des Lösungsmittelsignals erkannt werden.

Da die Retentionszeiten bei Messungen über mehrere Tage stetig geringfügig abnahmen und somit vom Alter und der Beanspruchung der Säule beeinflußt wurden, sollen die in Tabelle 4 genannten Retentionszeiten lediglich zur Orientierung dienen.

---

59) H. J. Roth, K. Eger, R. Troschütz; Pharmazeutische Chemie II, Arzneistoffanalyse; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1981

60) E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon; Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1976

61) H. Larsen; Acta chem. Scand., 15, 1395 (1961)

Tab. 4: HPLC-Retentionszeiten von Glucuroniden
(Durchschnittswerte)
Fließmittel: Gemische aus Acetonitril/Methanol (1+1) und Phosphatpuffer. Der Gehalt an Acetonitril/Methanol (1+1) ist in der ersten Spalte angegeben (X %).

X %	Glucuronid	Retentionszeit [min]	Detektion bei [nm]
2.5	Morphin-3-glucuronid(29)	2.6	275
10.0	p-Nitrophenol-glucuronid(27)	3.2	310
12.5	Codein-glucuronid(28)	2.1	275
15.0	Pentazocin-glucuronid(6)	7.9	275
20.0	2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)	2.6	258
20.0	2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)	3.2	258

2.3.3 Anwendung spektroskopischer Methoden zur Charakterisierung der Glucuronide[60) 62-64)]

2.3.3.1 Charakterisierung von 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)

Das UV-Spektrum von 16 in Methanol weist sechs Teilbanden bei 242, 248, 253, 258, 264 und 267 nm mit dem Hauptmaximum bei 258 nm auf, die dem Benzol-Chromophor zuzuordnen sind. Im IR-Spektrum* (Abb. 12) können die Banden bei 1605 cm^{-1}(m), 1585 cm^{-1}(w) und 1495 cm^{-1}(m) den Gerüstschwingungen und die Banden bei 760 cm^{-1}(m) und 700 cm^{-1}(m) den =C-H - Deformationsschwingungen des monosubstituierten Aromaten zugeordnet werden. Strukturelemente des Glucuronsäurerestes lassen sich durch die -OH und -COOH Valenzschwingungen bei 3600 - 2200 cm^{-1}(s), die Carbonylbande bei 1735 cm^{-1}(s) und die -C-O- Valenzschwingung bei 1140 - 1000 cm^{-1}(s) nachweisen.

Zur Auswertung der Spektren wurden herangezogen:

60) s. S. 48

62) D. H. Williams, I. Fleming; Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 3. Aufl.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1975

63) M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh; Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1979

64) G. Rücker; Spektroskopische Methoden in der Pharmazie, Bd. I und II; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1976

* IR-Spektrum: s = stark; m = mittel; w = schwach

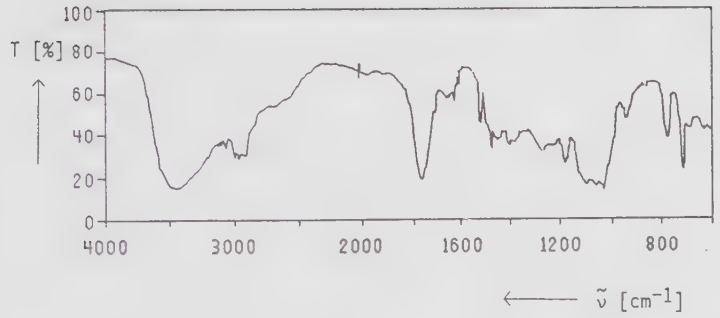


Abb. 12: IR-Spektrum der Substanz 16 (KBr-Preßling)

Durch den Vergleich der IR-Spektren von 2-Phenyl-propan-1-glucuroniden, die nach unterschiedlichen Aufarbeitungsschritten aufgenommen worden sind, kann erkannt werden, ob das Glucuronid als Salz(14) oder als freie Säure(16) vorliegt. Der Unterschied der Spektren von 14 und 16 besteht in der Bandenlage der Carboxyl-Gruppe. Alle Spektren, die nach dc-Reinigung aufgenommen worden sind, zeigen bei 1580 - 1560 cm^{-1}(s) und bei 1410 cm^{-1}(s) die Banden des Carboxylatanions. Diese Banden lassen sich durch das Vorliegen des Natriumsalzes des Glucuronides(14) erklären. Nach Abtrennung der Kationen wird bei 16 die für freie Carboxylgruppen charakteristische starke Bande bei 1735 cm^{-1}(s) angeregt. Der spektroskopische Befund, daß 16 als freie Säure vorliegt, wird durch weitere Untersuchungen gestützt. Bei der Prüfung in der Bunsenflamme war in 16 im Gegensatz zu 14 kein Natrium nachweisbar.

Für die freie Carboxylgruppe spricht auch der in einer 1 %igen wäßrigen Lösung von 16 gemessene pH-Wert von ca. 3, während für 14 unter gleichen Bedingungen ein pH-Wert von über 7 bestimmt wurde.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum* (Abb. 13) von 16 lassen sich die Protonen des Aromaten bei δ = 7.29 ppm (s; 5H) und die Protonen der Methylgruppe des Aglykons bei δ = 1.23 ppm (d; 3H; J = 7 Hz) erkennen. Das Methinproton des Aglykons sollte in dem Multiplett bei δ = 2.70 - 3.30 ppm lokalisiert sein. Vier Linien dieses Multipletts weisen eine der Methylgruppe entsprechende Kopplungskonstante von 7 Hz auf. Die Methylenprotonen, die im ^{1}H-NMR-Spektrum von 1 bei δ = 3.65 ppm (t; 2H; J = 7 Hz) anzutreffen sind, befinden sich im Multiplett bei δ = 3.52 - 3.68 ppm. Auch hier konnte für zwei Linien eine Kopplungskonstante von 7 Hz bestimmt werden. Die Signale des Glucuronsäurerestes δ = 3.10 - 4.30 ppm sind stark strukturiert und überlagern sich, so daß bei dem Auflösungsvermögen des 90 MHz-NMR-Gerätes eine eindeutige Zuordnung nicht möglich ist. Eine Ausnahme bildet das für die Konfigurationsbestimmung wichtige Signal des Protons am glykosidischen Kohlenstoffatom C-1. Das Dublett des Protons zeigt eine chemische Verschiebung von δ = 4.28 ppm mit einer vicinalen Kopplungskonstanten von 8 Hz.

---

* Für die Aufnahme der ^{1}H-NMR-Spektren danke ich Herrn Chem. Ing. C. Schmidt, Zentralanalytik der Chemischen Institute, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

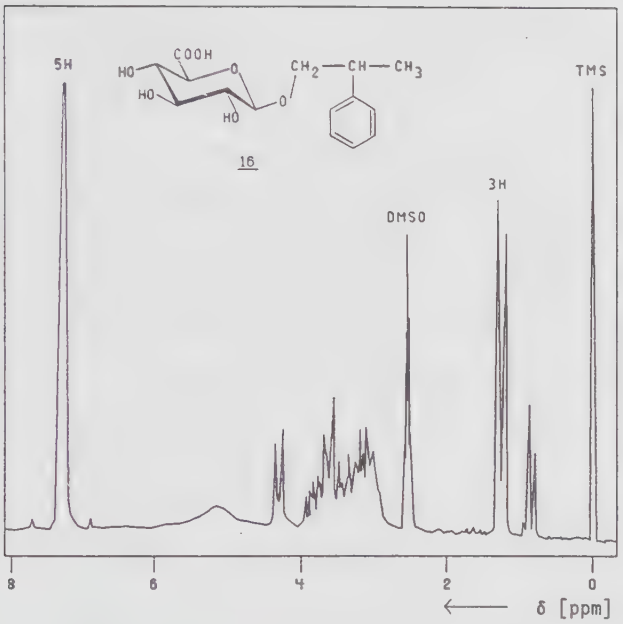


Abb. 13: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung 16

Diese verhältnismäßig große Kopplungskonstante spricht für die trans-diaxiale Anordnung der Methinprotonen am C-1 und C-2 des Glucuronsäurerestes und somit für die β-Konfiguration des Glucuronides. Diese konnte auch durch die enzymatische Spaltung von 16 mit β-Glucuronidase bestätigt werden. Die Halbwertszeit für die β-Glucuronidasespaltung von 16 beträgt ca. 11 Stunden (Bedingungen siehe Kap. 4.4).

Massenspektroskopische Untersuchungen durch Negativ Ion Fast-Atom-Bombardment - Massenspektroskopie (NIFABMS)* 65) 66) und Chemische Ionisation mit NH_3 als Reaktandgas (CI/NH_3MS)** 67) ergeben für 16 eine Mol.-Masse von 312, die mit der durch Elementaranalyse bestätigten Summenformel C_{15} H_{20} O_7 übereinstimmt.

Die NIFABMS liefert in den Matrizes Thioglycerin und Triethanolamin das Quasimolekülion von 16 bei m/e 311(100%) = $[M-H]^-$. In der Matrix Thioglycerin wird nur das Signal bei m/e 311(100%) registriert. Das in Abbildung 14 dargestellte NIFABMS von 16 mit Triethanolamin als Matrix enthält neben dem Quasimolekülion bei m/e 311(100%) noch drei Fragmente geringer Intensität bei m/e 297(1%) = $[M-CH_3]^-$, m/e 293(1%) = $[M-H_2O-H]^-$ und m/e 193(1%) = $[Glucuronsäure-H]^-$. Die weiteren Signale des Spektrums werden auf die verwendete Matrix Triethanolamin zurückgeführt.

---

* Für die Aufnahmen der NIFAB-Massenspektren danke ich Herrn Prof. Dr. H. Egge, Institut für Physiologische Chemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn und Herrn Dr. D. Böhler, Institut für anorganische Chemie der Georg-August Universität Göttingen.

** Für die Messungen der CI/NH_3-Massenspektren danke ich Herrn Dr. H. Brzezinka, Institut für Rechtsmedizin, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

65) A. L. Burlingame, J. O. Whitney; Anal. Chem., 56, 417R (1984)

66) W. Gielsdorf, P. Farrow; Z. Rechtsmed., 89, 191 (1982)

67) T. Cairns, E. G. Siegmund; Anal. Chem., 54, 2456 (1982)

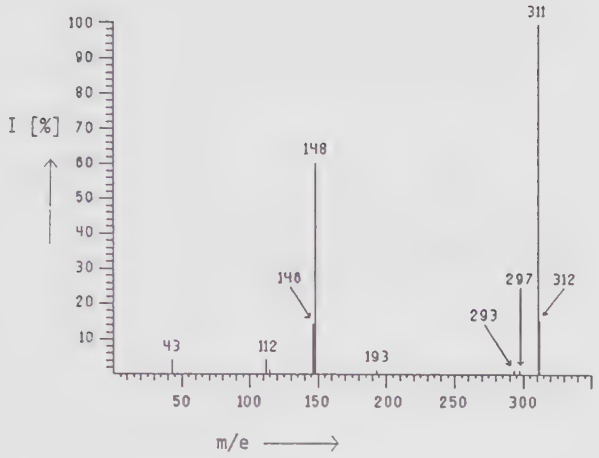


Abb. 14: NIFAB-Massenspektrum der Verbindung 16
(Matrix: Triethanolamin)

Das CI/NH_3MS (Abb. 15) mit dem Quasimolekülion bei m/e 330(100%) = $[M+NH_4]^+$ läßt drei Fragmentierungswege erkennen (Abb. 16). Die Abspaltung von Neutralmolekülen wie CO_2, H_2O und NH_3 aus dem Gesamtmolekül (Weg 1) führt zu den Signalen bei m/e 312(35%), 295(11%), 277(10%), 259(5%) und 233(10%). Nach Spaltung der glykosidischen Bindung kann bei 16 die positive Ladung sowohl auf dem Aglykon (Weg 2) als auch auf dem Glucuronsäurerest (Weg 3) lokalisiert sein. Dies führt für das Aglykon zu den Fragmenten bei m/e 154(64%), 136(59%), 119(98%), 105(96%) und 91(81%) und für die Glucuronsäure zu den Fragmenten bei m/e 194(49%) und 176(10%). Weitere Zuordnungen können nicht getroffen werden.

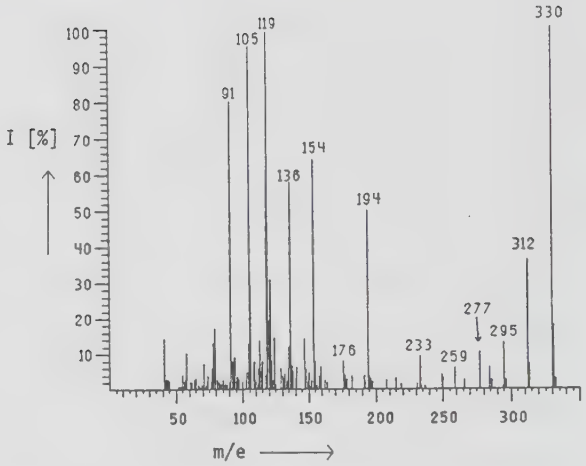


Abb. 15: CI/NH_3-Massenspektrum der Verbindung 16

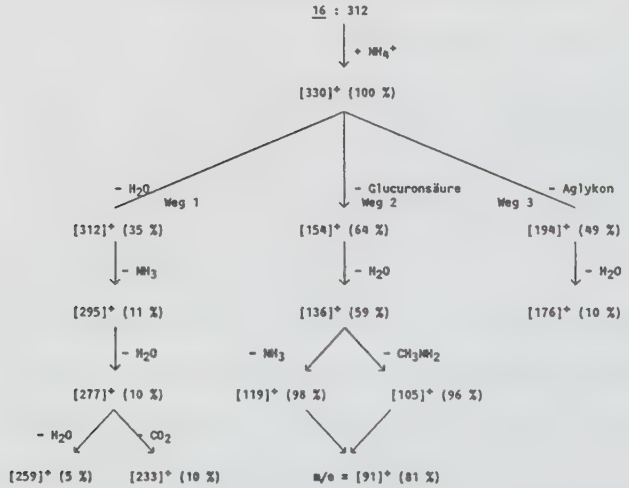


Abb. 16: Fragmentierung von 16 unter den Bedingungen der Chemischen Ionisation mit NH_3 als Reaktandgas

Substanz 16 wurde von D. Robinson[15] bei den Metabolismus-untersuchungen von Cumol(4) als Metabolit erwähnt, aber erst nach Derivatisierung zum Derivat 13 charakterisiert. Die freie Verbindung 16 wurde bisher nicht isoliert oder charakterisiert.

2.3.3.2 Charakterisierung von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)

Da es nicht gelungen ist, auf synthetischem Wege größere Mengen 22 zu erhalten, wird die Identifizierung (UV-, IR- und ^{1}H-NMR-Spektren) mit dem aus Mäuseurin angereicherten Produkt(22a), das neben Salzen eventuell noch andere Urinbestandteile enthält, durchgeführt. Für die Aufnahme der Massenspektren wurde aus Mäuseurin isolierte, kristallisierte Substanz 22 verwendet.

Die UV-Spektren von 2 und 22a in Methanol ergeben für den Aromaten ein UV-Maximum bei 257 nm mit zwei Teilbanden bei 252 nm und 264 nm. Dagegen gibt D. Robinson[15] ein UV-Maximum bei 247 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von ϵ = 558 (Methanol) an. Eine Erklärung für diese Unterschiede bietet ein Vergleich der UV-Daten strukturähnlicher Verbindungen. Die UV-Maxima von Toluol, Ethylbenzol, Cumol, Benzylalkohol, Phenyl-ethan-1-ol, Phenyl-ethan-2-ol und 2-Phenyl-propan-1-ol(1) liegen, in Methanol gemessen, alle bei 257 - 260 nm. Als molare Extinktionskoeffizienten werden Werte zwischen 150 und 300 angegeben. Verbindungen, die neben dem Aromaten eine konjugierte Doppelbindung besitzen, wie Styrol und 2-Phenyl-propen(21), haben ein UV-Maximum bei 243 - 245 nm mit ϵ-Werten zwischen 10000 und 15000. Da das von D. Robinson[15] für 2 angegebene UV-Maximum im Bereich der Bande der ungesättigten Verbingungen liegt und außerdem der molare Extinktionskoeffizient um den Faktor 2 - 3 größer ist, ist anzunehmen, daß der von D. Robinson[15] verwendete tertiäre Alkohol mit

2-Phenylpropen(21) verunreinigt war, und so die Teilbanden bei 252, 257 und 264 nm von der Bande des Styrolderivates überlagert wurden. Diese Annahme konnte durch ein Experiment gestützt werden. Zu einer methanolischen Lösung von 2 wurden in einer UV-Küvette 10 Tropfen mit Chlorwasserstoff gesättigtem Ether gegeben. Nach Umschütteln der Lösung wurde alle 10 Min ein UV-Spektrum aufgenommen. Während dieser Messungen änderte sich das UV-Maximum von 257 nm über 245 nm (20 min) nach 242 nm (40 min), unter gleichzeitiger Zunahme der im Maximum gemessenen Extinktion ($E_{0\ min} = 0.34$, $E_{60\ min} = 0.78$).

Das Aglykon 2 läßt sich im IR-Spektrum (Abb. 17) an Hand der Gerüstschwingungen des Aromaten bei 1500 cm^{-1}(m) und drei =C-H Deformationsschwingungen bei 770 cm^{-1}(m), 760 cm^{-1}(m) und 700 cm^{-1}(m) als monosubstituierter Aromat erkennen. Die für Aromaten bei ca. 1600 cm^{-1} erwartete Bande fällt mit der Bande des Carboxylations zusammen. Strukturelemente der Glucuronsäure wie -OH, -COOH und -C-O- können durch die Banden bei 3700 - 2400 cm^{-1}(s) und 1160 - 1000 cm^{-1}(s) bestätigt werden. Die Banden bei 1620 cm^{-1}(s) und 1460 - 1400 cm^{-1}(s) entsprechen den Banden eines Carboxylatanions und erlauben die Aussage, daß 22a als Salz vorliegt. Dies konnte durch den pH-Wert einer 1 %igen wäßrigen Lösung von über 7 und durch den flammenspektroskopischen Nachweis von Natrium in der Bunsenflamme bestätigt werden.

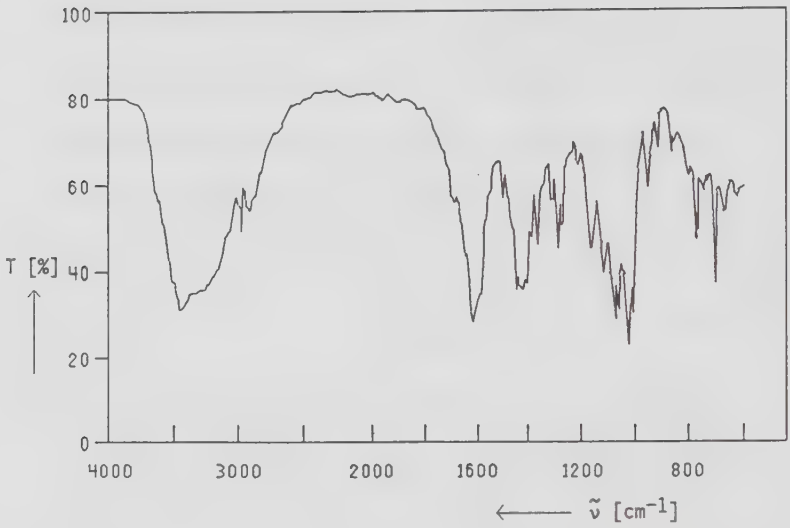


Abb. 17: IR-Spektrum der Verbindung 22a (KBr-Preßling)

Für den monosubstituierten Aromaten von 22a wird im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 18) ein Multiplett bei δ = 7.11 - 7.67 ppm registriert, dessen Integral 5 Protonen entspricht. Die beiden Methylgruppen sind durch einen quartären Kohlenstoff getrennt und werden als Singuletts registriert. Durch die Kondensation von 2 mit dem chiralen Glucuronsäurerest werden aus den enantiotopen Methylgruppen diastereotope Methylgruppen, die magnetisch nicht mehr äquivalent sind und daher zwei Singuletts bei δ = 1.47 ppm (3H) und 1.56 ppm (3H) bilden. Im Bereich von δ = 3.1 ppm bis ca.

5.3 ppm weist das Spektrum ein breites, strukturarmes Signal auf, dessen Integral 20 Protonen entspricht. Innerhalb dieses Signals ist ein Singulett bei δ = 3.09 ppm (H_2O) und ein Dublett bei δ = 4.25 ppm (J = 8 Hz) erkennbar.

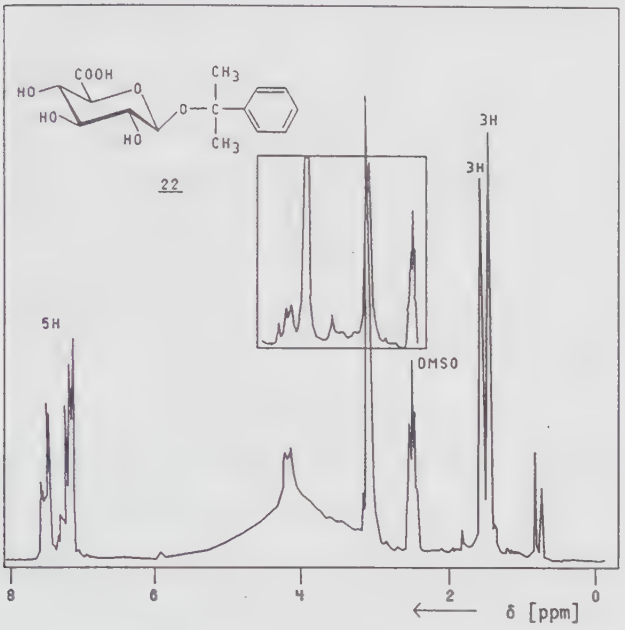


Abb. 18: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung 22a

Nach D_2O-Austausch sind in diesem Bereich 6 Signale differenzierbar. 4 Signale (3.27 ppm, m, 1H; 3.47 ppm, m, 1H; 3.56 ppm, m, 1H und 4.11 ppm, m, 1H) entsprechen den Methinprotonen an C-2 bis C-5 der Glucuronsäure. Bei dem Dublett mit der chemischen Verschiebung von δ = 4.25 ppm und der Kopplungskonstanten von 8 Hz handelt es sich um das Signal des glykosidischen Methinprotons an C-1 der Glucuronsäure.

Obwohl die β-Konfiguration von 22a durch die verhältnismäßig große Kopplungskonstante bewiesen wird, läßt sich das Glucuronid mit β-Glucuronidase nicht spalten. Für die β- Glucuronidase-spaltung wurde 22a in einer mit H_3PO_4 auf pH 5 eingestellten Acetatpufferlösung gelöst. Die Hälfte der Lösung versetzte man mit β-Glucuronidase und inkubierte beide Lösungen 96 Stunden bei 37 °C (Bedingungen siehe Kap. 4.4). In beiden Fällen wurden ca. 32 % des Glucuronides gespalten. Offenbar erfolgte die Spaltung durch die Acidität der Pufferlösung. Als Ursache für die Stabilität von 22a gegenüber β-Glucuronidase könnten die fehlende Substratspezifität der verwendeten β-Glucuronidase, und/oder die sterische Hinderung der enzymatischen Hydrolyse, und/oder die Anwesenheit von aus dem Urin mitextrahierten inhibierenden Substanzen vermutet werden[5].

Auf eine geringe Verunreinigung von 22a durch 2 deutet das schwach ausgeprägte Signal bei δ = 1.90 ppm hin, da das Proton der tertiären OH-Gruppe von 2 in diesem Bereich ein Singulett ergibt. Durch eine gc Untersuchung eines Etherextraktes von 22a konnte jedoch eine Verunreinigung durch 2 oder 21 ausgeschlossen werden.

Das NIFABMS (Abb. 19) liefert für 22 das Quasimolekülion bei m/e 311(60%) = $[M-H]^-$ und bestätigt die angenommene Summenformel $C_{15}\ H_{20}\ O_7$ mit der Mol.-Masse 312. Neben dem Quasimolekülion enthält das NIFABMS noch Fragmente bei m/e 297(6%) = $[M-CH_3]^-$, m/e 193(2%) = $[Glucuronsäure-H]^-$ und bei m/e 175(2%) = $[Glucuronsäure-H_2O-H]^-$. Die Signale bei m/e 148(100%), 146(21%) und 130(6%) sind auf die verwendete Matrix Triethanolamin zurückzuführen.

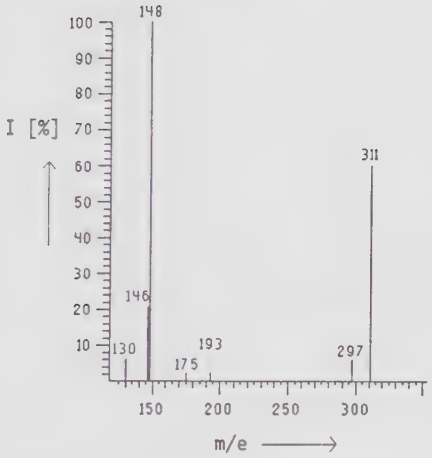


Abb. 19: NIFAB-Massenspektrum der Verbindung 22
(Matrix: Triethanolamin)

Da das Spektrum nur den Massenbereich ab m/e = 128 wiedergibt, sind charakteristische Fragmente des Aglykons zum Beispiel im Bereich m/e 115 bis 120 nicht erkennbar. Der untere Massenbereich wurde ausgeblendet, um ein intensives Signal für das Molekülion zu erhalten.

Im Gegensatz zum CI/NH_3MS von 16, wo drei Fragmentierungswege mit intensiven Signalen erkannt werden konnten, liegt im CI/NH_3MS von 22 nur ein Fragment des Aglykons bei m/e 119(100%) = $[C_9H_{11}]^+$ (vgl. Kap. 4.1.2) vor (Abb. 20, 21).

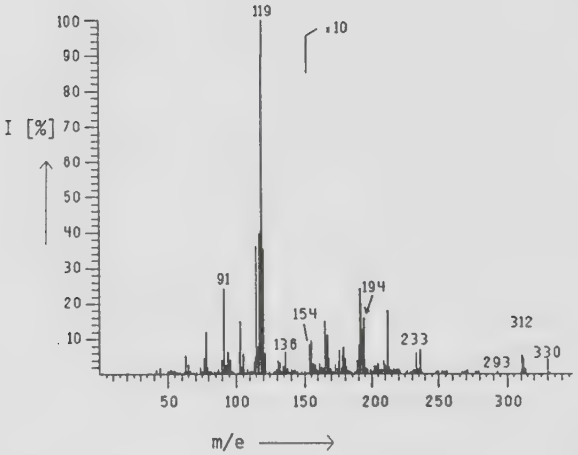


Abb. 20: CI/NH_3-Massenspektrum der Verbindung 22

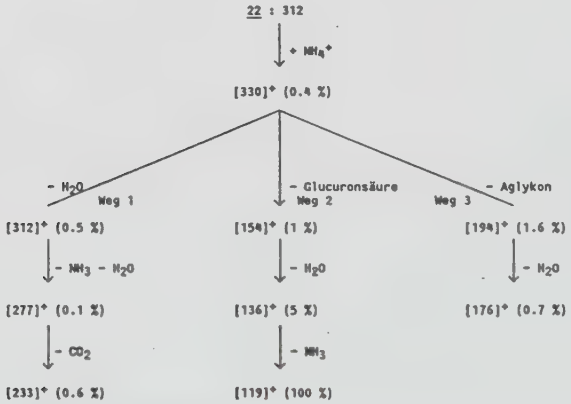


Abb. 21: Fragmentierung von 22 unter den Bedingungen der Chemischen Ionisation mit NH_3 als Reaktandgas

Das Quasimolekülion bei m/e 330(0.4%) = $[M+NH_4]^+$ und die Fragmente, die durch Abspaltung von CO_2, H_2O und NH_3 erhalten werden, besitzen nur geringe Intensität. Dasselbe gilt für die Fragmente der Glucuronsäure, die nach Spaltung der glykosidischen Bindung erhalten werden.

2.3.3.3 Charakterisierung von Pentazocin-glucuronid(6)

Bei UV-Messungen von 6 in Methanol (λ_{max} = 275 nm; ϵ = 1300), 0.1 N-HCl (λ_{max} = 273 nm) und 0.1 N-NaOH (λ_{max} = 275 nm) konnte keine für phenolische OH-Gruppen charakteristische bathochrome Verschiebung des Maximums nachgewiesen werden. Damit ist gezeigt, daß die Glucuronidierung an der phenolischen OH-Gruppe des Pentazocins(3) erfolgt ist.

Dem Aglykon können im IR-Spektrum (Abb. 22) die Banden der Gerüstschwingung des Aromaten bei 1495 cm^{-1}(m), der isolierten Doppelbindung bei 1670, 880, 850 cm^{-1}(w) und der Valenzschwingung des Phenolethers (=C-O-) bei 1235 cm^{-1}(m) zugeordnet werden. Auch in diesem Fall wird die für den Aromaten erwartete Bande bei 1600 cm^{-1} von der Carboxylatbande überlagert. Die COOH-, OH- und -C-O-Valenzschwingungen des Glucuronsäurerestes von 6 werden, wie bei 16 und 22a, bei 3600 - 2200 cm^{-1}(s) und bei 1130 - 1000 cm^{-1}(s) angeregt. 6 ist als amphotere Verbindung in der Lage innere Salze zu bilden. Daher liegt die Carboxyl-Gruppe der Glucuronsäure hauptsächlich als Carboxylatanion vor, so daß die Unterscheidung, ob das Glucuronid als inneres Salz oder als Salz (z. B. mit Alkalikationen) vorliegt, nicht so eindeutig wie bei 16 gelingt. Unterschiede der Spektren von 24 (Natriumsalz des Glucuronides nach dc - Reinigung) und 6 sind bezüglich der Lage der Carboxylat-Bande (1575 cm^{-1}(s), 1605 cm^{-1}(s)) und dem Auftreten neuer Banden bei 1740 cm^{-1}(m) und 2360 cm^{-1}(w) festzustellen. Die Bande bei 1740 cm^{-1} ist sehr breit und im Gegensatz zu normalen Carbonylbanden nur mittelstark ausgeprägt. Sie spricht jedoch dafür, daß ein Teil der Carboxylgruppen als COOH- Gruppen vorlie-

gen. Die sehr schwache Bande bei 2360 cm^{-1} wird als Hinweis auf das Vorliegen eines inneren Salzes gewertet, da in dem Bereich von 2700-2250 cm^{-1} Ammoniumionen angeregt werden[23]. Die Messungen des pH-Wertes in 1 %igen wäßrigen Lösungen (24: pH 7 bis 8; 6: pH ca. 5) und die flammenspektroskopischen Untersuchungen auf Natrium unterstützen die Interpretation des IR-Spektrums.

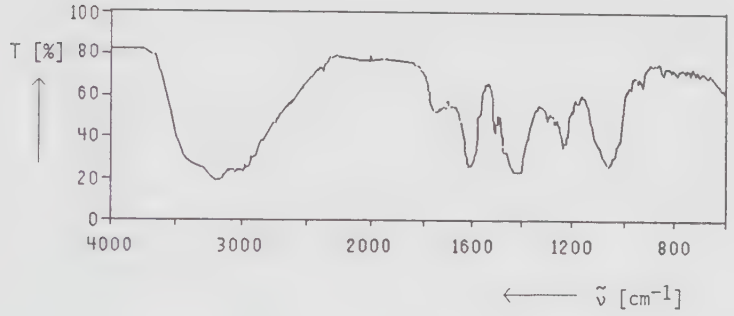


Abb. 22: IR-Spektrum der Verbindung 6 (KBr-Preßling)

Im ^{1}H-NMR-Spektrum von 6 (Abb. 23) lassen sich die Protonen der tertiären (δ = 0.75 ppm, d, 3H, J = 6 Hz), quartären (δ = 1.29 ppm, s, 3H) und olefinischen Methylgruppen (δ = 1.69 ppm, d, 6H, J = 3 Hz), sowie des Aromaten (δ = 6.75 - 7.15, m, 3H) durch ihre chemische Verschiebung und ihre Integralhöhe eindeutig zuordnen. Im Bereich der Methylen- und Methin-Protonen von δ = 1.9 - 3.9 ppm lassen sich die einzelnen Gruppen wegen der nicht ausreichenden Auflösung des 90-MHz-NMR - Gerätes

nicht differenzieren. Die Entscheidung, ob α- oder β- Konfiguration vorliegt, kann aufgrund des vorliegenden Spektrums nicht getroffen werden, da das Signal des Methinprotons an C-1 der Glucuronsäure und das durch Allylkopplung mit den Methylgruppen verbreiterte Triplett der $-\underline{CH}=C(CH_3)_2$ - Gruppe eine ähnliche chemische Verschiebung besitzen und zusätzlich von einem breiten Signal einer OH-Gruppe überlagert wird, so daß das Gesamtsignal bei δ = 5.22 ppm keine definierte Aufspaltung erkennen läßt. Die β-Konfiguration konnte nur durch die enzymatische Spaltung von 6 mit β-Glucuronidase bewiesen werden. Die Halbwertszeit für die β-Glucuronidasespaltung von 6 beträgt 44 Stunden (Bedingungen vgl. Kap. 4.4).

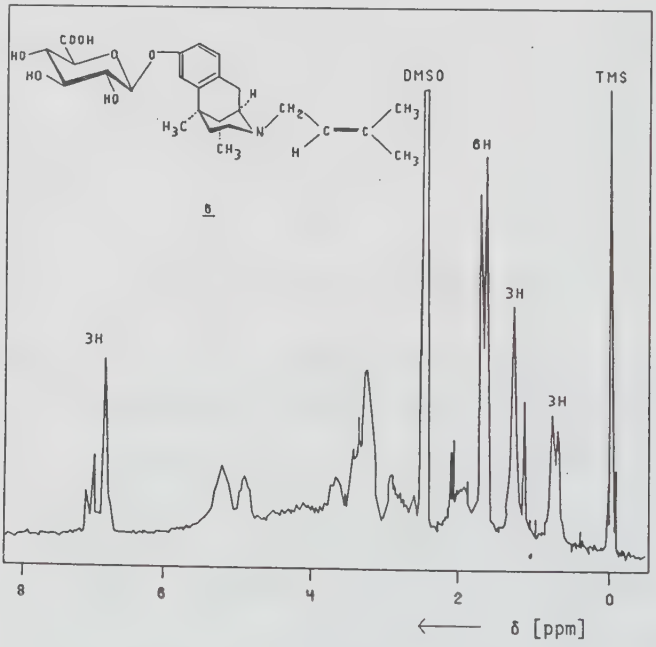


Abb. 23: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung 6

Das NIFABMS in der Matrix Thioglycerin enthält fünf intensive Signale (Abb. 24). Das Quasimolekülion bei m/e 460(100%) = $[M-H]^-$ entspricht der Mol.-Masse von 461, die mit dem Ergebnis der Elementaranalyse im Einklang steht. Das Fragment bei m/e 389(17%) kann durch die Abspaltung der Dimethylallylseitenkette des Aglykons (C_4H_7) und eines Mols H_2O erklärt werden. Die drei Signale bei m/e 107(68%), 215(25%) und 321(25%) sind auf die Matrix zurückzuführen.

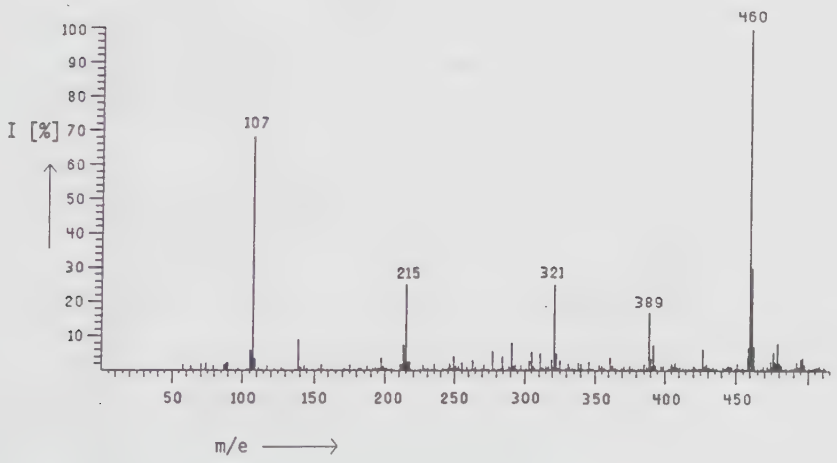


Abb. 24: NIFAB-Massenspektrum der Verbindung 6
(Matrix: Thioglycerin)

Unter den Bedingungen der CI/NH_3MS erfolgt die Fragmentierung von 6 hauptsächlich an der glykosidischen Bindung (Abb. 25). Dabei wird die positive Ladung bevorzugt auf dem aromatischen System und/oder dem tertiären Stickstoff des Aglykons stabilisiert. Dies führt zu dem Basispeak bei m/e 286(100%) =

$[Aglykon+H]^+$ und weiteren Fragmenten des Aglykons bei m/e 270(4%), 230(8%), 217(17%), 202(3%), 173(3%), 110(2%) und 70(2%). Von dem Glucuronsäurerest können unter diesen Bedingungen keine Signale nachgewiesen werden. Die Signale bei m/e 444(0.3%), 400(0.3%), 380(0.5%) und 366(0.7%) lassen sich durch Abspaltungen von Neutralmolekülen wie H_2O, NH_3 und CO_2 erklären.

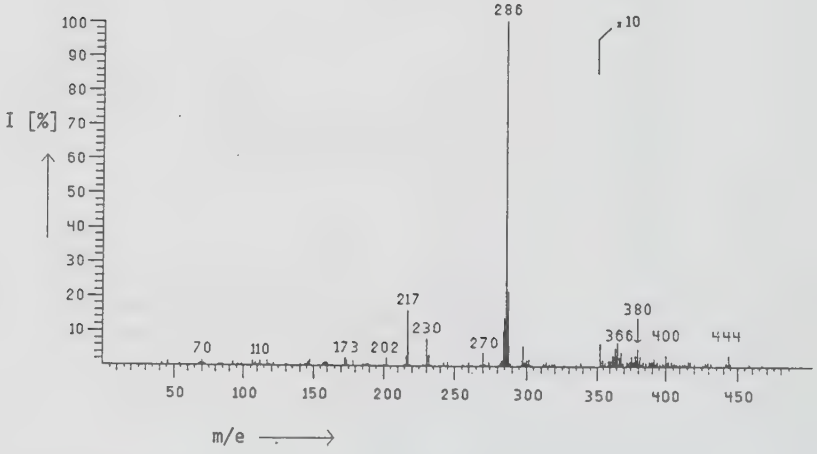


Abb. 25: CI/NH_3-Massenspektrum der Verbindung 6

2.4 Spaltung von β-D-Glucuroniden mit Salzsäure

2.4.1 Allgemeine Bemerkungen zur Spaltung von β-D-Glucuroniden mit Salzsäure

Um Aussagen über die hydrolytische Spaltung der glykosidischen Bindung machen zu können, ist es erforderlich, Fehlermöglichkeiten auszuschließen oder die Fehlerbreite zu quantifizieren. Als Fehlermöglichkeiten kommen in Betracht: die teilweise Extraktion von Konjugaten mit organischen Lösungsmitteln[4)], Bildung von Artefakten und Verluste durch unvollständige Hydrolyse der Konjugate, Verluste durch Zerstörung der Aglyka und Verluste, die durch die Aufarbeitung entstehen.

Bei allgemeinen Screening-Untersuchungen hätte die teilweise Extraktion von Glucuroniden mit organischen Lösungsmitteln zur Folge, daß der Anteil an Glucuronid, der durch saure Hydrolyse gespalten werden soll, vermindert wird. In den verschiedenen Extrakten wären dann Glucuronide enthalten, die durch die angewandten Methoden z. B. DC, GC u. a. nicht erfaßt werden, wenn man nicht gezielt auf die Konjugate untersucht. Dadurch kann die quantitative Bestimmung nach Hydrolyse des Glucuronides zu falschen Ergebnissen führen.

Zur Abschätzung der Extraktionsraten wurden wäßrige Lösungen der Glucuronide 16 und 6 mit verschiedenen Lösungsmitteln bei verschiedenen pH-Werten extrahiert und die durch die Extraktion bedingte Abnahme der Extinktion am UV-Maximum bestimmt. Auf diese Weise konnten für 16 Extraktionsraten von 21 bis 35 % und für 6 von 1 bis 14 % ermittelt werden (vgl. Kap. 4.5)

Um in den vorliegenden Untersuchungen diese Fehlermöglichkeit auszuschließen, wurden die Glucuronide in Wasser gelöst, unter den für die quantitativen Bestimmungen gewählten Bedingungen aufgearbeitet und gaschromatographisch untersucht. Bei keiner der Substanzen 16, 22 und 6 konnte Glucuronid, Aglykon oder Artefakt in den Extrakten nachgewiesen werden. Bei der quantitativen HPLC-Bestimmung mit UV-Detektion und der DC-Direktauswertung sind durch eventuell mitextrahiertes Glucuronid keine Verfälschungen der Ergebnisse zu erwarten, da unter den gewählten Bedingungen weder Zersetzung des Glucuronides, noch Überlagerungen der Signale von Glucuronid und Aglykon auftreten können. Diese Ergebnisse bestätigen, daß teilweise mitextrahierte Konjugate nur durch eine gezielte Analyse erfaßt werden können.

Zur Bestimmung der Verluste die durch Hydrolyse und Aufarbeitung bei der quantitativen Bestimmung entstehen, wurden die Wiederfindungsraten der Aglyka unter den jeweiligen Hydrolysebedingungen ermittelt. Mit dem Begriff Wiederfindungsrate wird der Teil an Aglykon beschrieben, der ohne Veränderung wiedergefunden wird. Für die Artefakte, die quantitativ bestimmt worden sind, wird die Ausbeute angegeben, deren Prozentgehalt auf die Molekularmasse des Aglykons bezogen wird. Aus der Wiederfindungsrate des Aglykons und der Ausbeute an Artefakt errechnet sich dann die Gesamtwiederfindungsrate.

Die Hydrolyserate stellt den eigentlichen Meßwert für die Qualität der angewandten Hydrolysemethode dar. Sie wird indirekt aus den Wiederfindungsraten nach Umsetzung des Aglykons und nach Hydrolyse des Glucuronides unter gleichen Bedingungen errechnet.

Zur Bestimmung der Hydrolyseraten wurden wäßrige Lösungen der Aglyka und Glucuronide unter folgenden in der forensischen Analytik üblichen Bedingungen hydrolysiert:

Methode I : Mit einer Salzsäurekonzentration von 20 % wurde das Reaktionsgemisch auf einer Heizplatte in einem offenen Gefäß 6 min gekocht.

Methode Ia : Wie Methode I; die Reaktionslösung wurde 6 min unter Rückfluß gekocht.

Methode II : Die Hydrolyse erfolgte in 12.5 % Salzsäurelösung. In einem offenen Gefäß wurde die Reaktionslösung 30 min im siedenden Wasserbad erhitzt.

Methode IIa : Wie Methode II; die Reaktionslösung wurde unter Rückfluß erhitzt.

Methode III : Es wurde mit 5 % Salzsäure 30 min im siedenden Wasserbad unter Rückflußkühlung hydrolysiert.

Entsprechend den Bedingungen der Methode III wurden auch Hydrolysen in 0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5 und 20.0 % Salzsäure durchgeführt (Methode IV).

2.4.2 Hydrolyse von 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)

Der Verlauf der Hydrolyse des Glucuronides 16 mit Salzsäure wurde über die quantitative Bestimmung des hydrolytisch freigesetzten 2-Phenyl-propan-1-ols(1) untersucht. Die quantitativen Bestimmungen erfolgten nach chromatographischer Trennung der Extrakte durch Kapillar-GC[68] und Reversed-Phase(RP)-HPLC[69] (vgl. Kap. 4.3) mit Benzylalkohol als internem Standard. Als Vertreter einer homologen Reihe lassen sich 1 und Benzylalkohol mit diesen Methoden gut trennen und ermöglichen kurze Analysenzeiten von ca. sieben Minuten. Die statistische Auswertung[70-72] der Eichkurven zeigt, daß mit beiden Verfahren gut reproduzierbare und übereinstimmende Ergebnisse erhalten werden. Die Gehaltsbestimmungen erfolgten in den durch die Eichkurven bestätigten linearen Konzentrationsbereichen durch Integratoren.

Für die Extraktion des Aglykons(1) aus der wäßrigen Hydrolyselösung mußte ein Extraktionsverfahren angewendet werden, bei dem keine Konzentrierung der Extrakte durch Destillation der organischen Lösungsmitteln notwendig war.

---

68) G. Schomburg; Gaschromatographie; 1. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1977

69) H. Engelhardt; Hochdruck Flüssigkeitschromatographie; Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1977

70) A. N. Martin, J. Swarbrick, A. Cammarata; Physikalische Pharmazie; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1975

71) K. Doerffel; Fresenius Z. analyt. Chem., 185, 1 (1962)

72) G. Stenzhorn; Pharm. Ztg., 124, 795 und 1369 (1979)

Vorversuche mit Lösungen von 1 in Dichlormethan, Chloroform und Diethylether hatten nämlich gezeigt, daß beim Einengen im Vakuum auch 1 teilweise verdampfte und daher die Wiederfindungsraten stark schwankten. Zu dem selben Ergebnis gelangte man bei den Versuchen, das Lösungsmittel durch Einleiten von Stickstoff (35 °C; Wasserbad) zu entfernen. Die Extraktion von 1 aus den wäßrigen Hydrolyselösungen erfolgte daher mit Extraktionssäulen vom Typ Baker®-Octadecyl-(C 18) (vgl. Kap. 4.1.1). Das Aglykon 1 wurde mit ca. 1.6 ml Chloroform (GC) bzw. Methanol (HPLC) von der Säule eluiert. Die quantitativen RP-HPLC-Bestimmungen konnten direkt, die GC- Bestimmungen erst nach Trocknen der Extrakte mit Natriumsulfat aus dem Überstand erfolgen.

Wie die Wiederfindungsraten von 100.4 ± 2.1 % (GC) und 97.1 ± 3.0 % (HPLC) belegen, gelang die Extraktion von 1 quantitativ. In Abbildung 26 sind sie für die verschiedenen Salzsäurekonzentrationen graphisch dargestellt.

Der Wert in Spalte 1 (ohne Salzsäure) gibt die Wiederfindungsrate nach Extraktion einer wäßrigen Lösung von 1 ohne vorheriges Erhitzen wieder. Der Wert 0.0 (Spalte 2) bezieht sich auf die Wiederfindungsrate nach 30 min Erhitzen unter Rückflußkühlung im siedenden Wasserbad (ohne Salzsäure).

Wie der Mittelwert der Wiederfindungsrate von 94.3 ± 2.9 % zeigt, kann die flüchtige Verbindung 1 mit den verwendeten Arbeitsbedingungen nahezu quantitativ erfaßt werden. Die Wiederfindungsrate des reinen Aglykons unter Hydrolysebedingungen nimmt mit steigender Salzsäurekonzentration (2.5 bis 20 % HCl) leicht ab und pendelt sich ab 12.5 % HCl zwischen 85 bis 90 % ein.

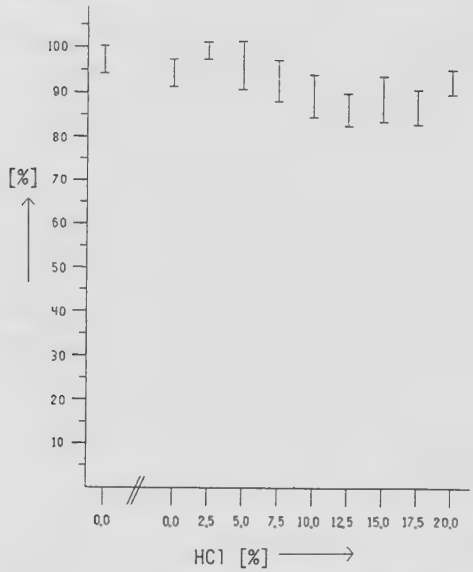


Abb. 26: Wiederfindungsraten* von 2-Phenyl-propan-1-ol(1) unter den Bedingungen der Hydrolyse mit Salzsäure (Methode IV)

Für die drei in der forensischen Analytik üblichen Verfahren ergeben sich Wiederfindungsraten von 88.0 ± 4.9 % für Methode Ia, 94.3 ± 4.8 % für Methode IIa und 95.1 ± 10.2 % für Methode III (Methoden vgl. Kap. 4.3). Artefakte konnten während der quantitativen Bestimmungen unter den angewandten Analysenmethoden nicht beobachtet werden.

---

*Das angegebene Intervall bezeichnet die aus den Meßwerten jeweils errechnete Standardabweichung. Die Unterschiede innerhalb einer Meßreihe ergeben sich aus der unterschiedlichen Streuung der Meßwerte.

Die Ergebnisse der salzsauren Hydrolyse von 16 sind in Abbildung 27 graphisch dargestellt.

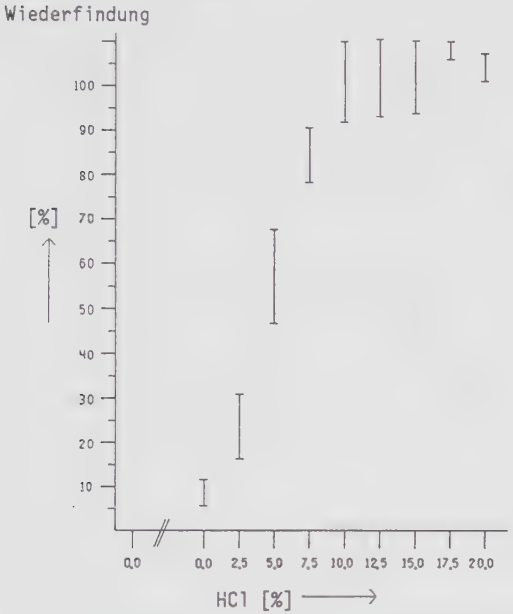


Abb. 27: Wiederfindungsraten von 1 nach Hydrolyse von 16 mit Salzsäure (Methode IV) (vgl. Fußnote S. 76)

In einer wäßrigen Lösung von 16 ohne vorheriges Erhitzen konnte das Aglykon 1 nicht nachgewiesen werden (Spalte 1; Salzsäurekonzentration 0.0). Daher kann eine Verunreinigung von 16 durch 1 ausgeschlossen werden. Außerdem wird die Aufarbeitung und die quantitative Bestimmung von 1 durch 16 nicht gestört.

Für die hydrolytische Spaltung von ca. 7 % des Glucuronides nach 30 min Kochen in wäßriger Lösung ohne Salzsäurezusatz (Spalte 2; Salzsäurekonzentration 0.0) kann die Acidität hervor-

gerufen durch die Säurestärke des Glucuronides (pH-Wert einer 1 % wäßrigen Lösung von 16: ca.3) als Ursache angenommen werden. Zur Abschätzung der für die quantitative Hydrolyse von 16 notwendigen Salzsäurekonzentration wurde im annähernd linearen Bereich zwischen 0.0 und 10.0 % Salzsäure eine Regressionsrechnung durchgeführt (r = 0.996). Aus der Steigung der Geraden (10.5 % Hydrolyse/ 1 % HCl) läßt sich die für eine 100 %ige Spaltung notwendige Salzsäurekonzentration von 9 bis 10 % errechnen.

Ausgehend von den Wiederfindungsraten von 86.8 ± 4.6 % (Methode Ia), 94.9 ± 5.5 % (Methode IIa) und 65.7 ± 6.0 % (Methode III) ergeben sich Hydrolyseraten von 99 ± 5 % für Methode Ia, 101 ± 5 % für Methode IIa und 69 ± 6 % für Methode III.

2.4.3 Hydrolyse von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22a)

Die Hydrolyseraten des aus Mäuseurin angereicherten Glucuronides 22a gegenüber Salzsäure wurden ebenfalls über das hydrolytisch freigesetzte Aglykon 2 bestimmt. Neben 2 wurde auch das Artefakt 2-Phenyl-propen(21), das durch säurekatalysierte Dehydratisierung aus 2 gebildet wird, quantitativ erfaßt. Für die quantitativen Bestimmungen von 2 und 21 wurde die Kapillar-GC mit Benzylalkohol als internem Standard (vgl. Kap. 4.3) angewendet. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte durch einen Integrator in den durch Eichkurven bestätigten linearen Konzentrationsbereichen.

Die Extraktionen von 2 und 21 aus der wäßrigen Hydrolyselösung wurden, wie für 1 beschrieben, mit Hilfe von Extraktionssäulen

durchgeführt. Die Wiederfindungsraten (Abb. 28) von 96 ± 5 % (Spalte 1) und 95 ± 11 % (Spalte 2) zeigen, daß 2 mit dem Extraktionsverfahren quantitativ erfaßt wird, und daß nach 30 min Erhitzen ohne Salzsäure (Methode IV) praktisch kein Artefakt gebildet wird. Die Wiederfindungsrate sinkt jedoch schon bei geringen Salzsäurekonzentrationen (1 % HCL) rapide auf ca. 40 % ab und steigt bei höheren Konzentrationen (17.5 bis 20 % HCl) auf ca. 50 % an.

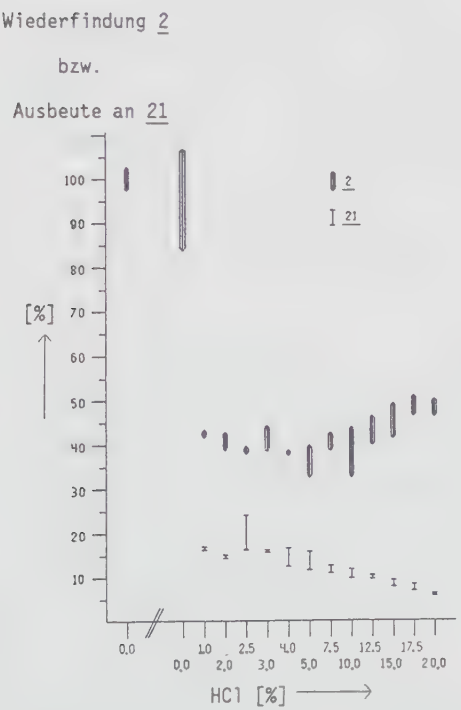


Abb. 28: Wiederfindungsraten von 2-Phenyl-propan-2-ol(2) und Ausbeute von 2-Phenyl-propen(21) nach Behandlung von 2 mit Salzsäure (Methode IV) (vgl. Fußnote S. 76)

Aus 2 werden unter Hydrolysebedingungen mehrere Artefakte gebildet; durch Änderung der GC-Bedingungen auf eine Ofentemperatur von 200 °C konnten ca. 30 Artefakte detektiert werden (Abb. 29), wobei eine zusätzliche Artefaktbildung unter gc-Bedingungen nicht ausgeschlossen werden kann. Die säurekatalysierte Dehydratisierung von 2 führt zunächst zu 2-Phenyl-propen(21). Dimerisierung, Polymerisation und andere Folgereaktionen ergeben dann eine Vielzahl von Reaktionsprodukten, die teilweise wegen ihrer hohen Molekülmasse und der damit verbundenen geringeren Löslichkeit in Chloroform nicht mehr nachgewiesen werden konnten[73-75]. Die Konzentrationen dieser Artefakte waren jedoch im Vergleich zu den Konzentrationen von 2 und 21 gering, wie sich aus der Summe von 2 und 21 ergibt. Neben der Dehydratisierung scheint auch eine Hydratisierung von 21 zu 2 möglich zu sein, da mit steigender Salzsäurekonzentration die Wiederfindungsrate von 2 ansteigt (Abb. 28).

Obwohl durch die Polymerisation von 21 mit einer stetigen Abnahme der Wiederfindungsrate an 2 zu rechnen wäre, nimmt die Wiederfindungsrate mit steigender Salzsäurekonzentration (1 bis 20 % HCl) zu und beträgt durchschnittlich 41.7 %. Die Konzentration des Artefaktes 21 nimmt jedoch unter gleichen Bedingungen von 16.7 ± 0.4 % in 1 % HCl auf 6.1 ± 0.2 % in 20 % HCl kontinuierlich ab.

---

73) H. Staudinger, F. Breusch; Ber. dtsch. chem. Ges., 62, 442 (1929)

74) E. Bergmann, H. Taubadel, H. Weiß; Ber. dtsch. chem. Ges. 64, 1493 (1931)

75) A. Dierichs, E. Preu; Chem. Ber. 90, 1208 (1957)

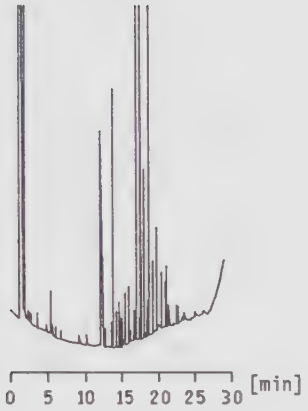


Abb. 29: Gaschromatogramm nach Behandlung von 2 mit 12.5 % Salzsäure (Ofentemperatur: 200 °C)*

Wegen der Zunahme der Aglykonkonzentration und der gleichzeitigen Abnahme der Artefaktausbeute mit steigender Salzsäurekonzentration lag die durchschnittliche Gesamtwiederfindungsrate, berechnet aus 2 und 21, bei 53.8 %. Die Ergebnisse der salzsauren Hydrolyse von 2 für die drei Methoden Ia,IIa und III sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

---

*GC-Bedingungen vgl. Kap. 4.3.2.2 (Kapillar-GC)

Tab. 5 : Wiederfindungsrate von 2 und Ausbeute an 21 nach Behandlung von 2 mit Salzsäure

	Gehalt [%] : Methode		
	Ia	IIa	III
Aglykon 2	42.7 ± 3.4	43.5 ± 3.2	34.4 ± 3.9
Artefakt 21*	5.6 ± 0.8	5.8 ± 0.7	14.3 ± 1.3
Gesamt 2 + 21*	48.3 ± 3.5	49.3 ± 3.3	48.7 ± 4.1

*berechnet als 2

Obwohl die Versuche mit 22a, einer Substanz von nicht genau bekannter Reinheit durchgeführt worden sind, können durch die Untersuchungen (Abb. 30) aussagefähige Ergebnisse erhalten werden.

Zunächst können durch die Ergebnisse der Spalten 1 und 2 in Abbildung 30 Verunreinigungen der Substanz 22a durch 2 oder 21 ausgeschlossen werden. Die Wiederfindungsrate des Aglykons 2 nimmt, wie auch bei den Untersuchungen des nicht glucuronidierten Aglykons selbst, mit steigender Salzsäurekonzentration zwischen 1 und 2o % HCl zu und liegt durchschnittlich bei 24.7 %. Gleichzeitig nimmt die Ausbeute an Artefakt 21 von 12.7 % auf unter 5 % ab. Nach Hydrolyse des Glucuronides 22a nimmt die Gesamtwiederfindungsrate (2 + 21) mit steigender Salzsäurekonzentration von 37.6 % auf 28.3 % ab und liegt durchschnittlich bei 33.5 %. Setzt

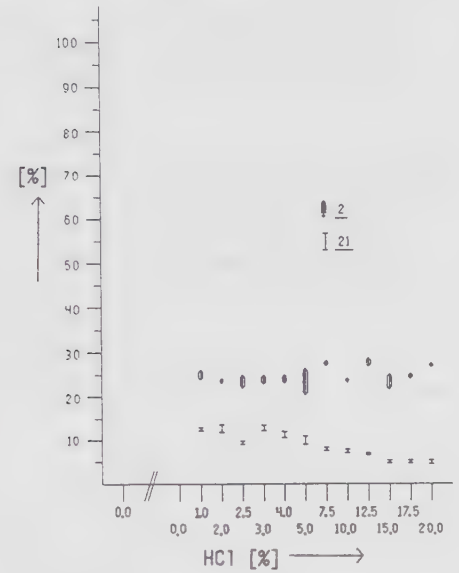


Abb. 30 : Wiederfindungsrate von 2 und Ausbeute an 21 nach Hydrolyse von 22a (Methode IV) (vgl. Fußnote S. 76)

man die Gesamtwiederfindundsraten nach Hydrolyse des Glucuronides mit denen nach Behandlung des Aglykons unter Hydrolysebedingungen ins Verhältnis, so läßt sich daraus für das aus Mäuseurin angereicherte Produkt 22a ein Gehalt von 60 bis 65 % an 22 errechnen. Hydrolyseraten von über 60 %, bezogen auf die Gesamtwiederfindungsraten, entsprechen daher einer 100 %igen Spaltung des Glucuronides 22. Diese Überlegung erlaubt mit den vorliegenden Ergebnissen den Schluß, daß 22a schon mit Salzsäurekonzentrationen von 1 % oder weniger quantitativ gespalten wird.

Weil das Glucuronid schon mit niedrigen Säurekonzentrationen hydrolytisch gespalten wird, ist nicht auszuschließen, daß die Säurestärke der freien Glucuronsäure für eine Eigenhydrolyse des Glucuronides ausreicht. Dies könnte eine Erklärung für die Schwierigkeit sein, das Glucuronid 22 rein darzustellen oder zu isolieren.

Für die Methoden Ia,IIa und III ergeben sich die in den Tabellen 6 und 7 aufgeführten Wiederfindungsraten und die daraus errechneten Hydrolyseraten, wobei Hydrolyseraten über 60 % einer quantitativen Spaltung entsprechen.

Tab. 6 : Wiederfindungsrate von 2 und Ausbeute an 21 nach Behandlung von 22a mit Salzsäure

	Gehalt [%] : Methode		
	Ia	IIa	III
Aglykon 2	26.5 ± 0.2	26.8 ± 1.0	23.4 ± 2.9
Artefakt 21*	5.0 ± 0.1	6.8 ± 0.2	10.1 ± 1.0
Gesamt 2 + 21*	31.5 ± 0.2	33.6 ± 1.0	33.5 ± 3.1

*berechnet als 2

Tab. 7 : Hydrolyseraten von 22a nach Hydrolyse mit 20, 12.5 und 5 %iger Salzsäure

Hydrolyserate bezogen auf	Methode		
	Ia [%]	IIa [%]	III [%]
Aglykon 2	62.1	61.6	68.6
Artefakt 21*	89.3	117.4	70.6
Gesamt 2 + 21*	65.2	68.2	68.8

*berechnet als 2

2.4.4 Hydrolyse von Pentazocin-glucuronid(6)

Die Hydrolyse des Glucuronides 6 mit Salzsäure wird über das freigesetzte Aglykon Pentazocin(3) und ein Artefakt(30) bestimmt. Das Artefakt konnte als 1,2,3,4,5,6-hexahydro-6,11-dimethyl-3-(-3-hydroxy-3-methylbutyl)-2,6-methano-3-benzacocin-8-ol, im folgenden hydroxyliertes Pentazocin(30) genannt, identifiziert werden (vgl. Kap. 4.2.8). Wie schon früher berichtet wurde[76-78], wird 30 durch säurekatalysierte Hydroxylierung an der Dimethylallyl-Seitenkette von 3 gebildet (Abb. 31).

Für die quantitativen Bestimmungen von 3 und 30 wurden die GC[79] mit 2-Amino-5-chlorbenzophenon als internem Standard und die DC-Direktauswertung[80,81] nach Fluoreszenzanregung[82] angewendet. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte aus Eichkurven (vgl. Kap. 4.3)

---

76) K. Kigasawa, H. Shimizu, K.Ohkubo, R. Shoji; Yakugaku Zasshi, 96, 1342 (1976)

77) R. W. Reid, C. M. Gerbeck; Clin. Chem., 27, 10 (1981)

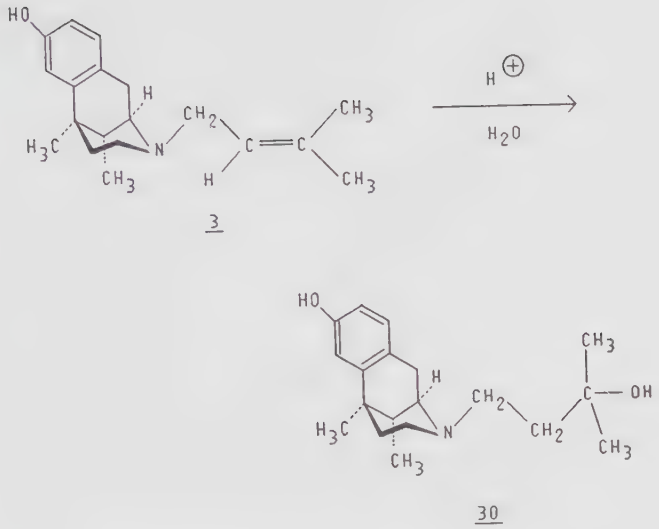
78) W. Gielsdorf, E. Klug, M. Tümmers; Z. Rechtsmed., 89, 181 (1982)

79) H. Berninger, M. R. Möller; Arch. Toxicol., 37, 295 (1977)

80) S. Ebel, E. Geitz, D. Klarner; Kontakte (Merck), 1/80, 11 (1980); 2/80, 12 (1980); S. Ebel, E. Geitz; Kontakte (Merck), 1/81, 44 (1981); 2/81, 34 (1981); S. Ebel, E. Geitz, J. Hoche, M. Kaul; Kontakte (Merck), 3/81, 19 (1981)

81) S. Thunell; J. Chromatogr., 130, 209 (1977)

82) I. Jane, J. F. Taylor; J. Chromatogr., 109, 37 (1975)



3

30

Abb. 31: Säurekatalysierte Hydroxylierung von Pentazocin(3) zu "hydroxyliertem Pentazocin"(30)

3 und 30 lassen sich aus wäßrigen Lösungen, die auf pH 8.5 eingestellt sind, mit Chloroform/Isopropanol (9+1) extrahieren[83]. Die getrennte Bestimmung der Wiederfindungsraten unter diesen Bedingungen ergab 95 ± 7 % für 3 und für 30 93 ± 6 %.

Bei der Behandlung mit Salzsäure (Methode IV) nehmen die Wiederfindungsraten an unverändertem Pentazocin(3) mit steigender Salzsäurekonzentration stark ab und liegen bei Salzsäurekonzentrationen über 12.5 % HCl zwischen 10 und 15 % (Abb. 32).

---

83) J. R. Monforte, R. Gault, J. Smialek, T. Goodin; J. Forensic Sci., 28, 90 (1983)

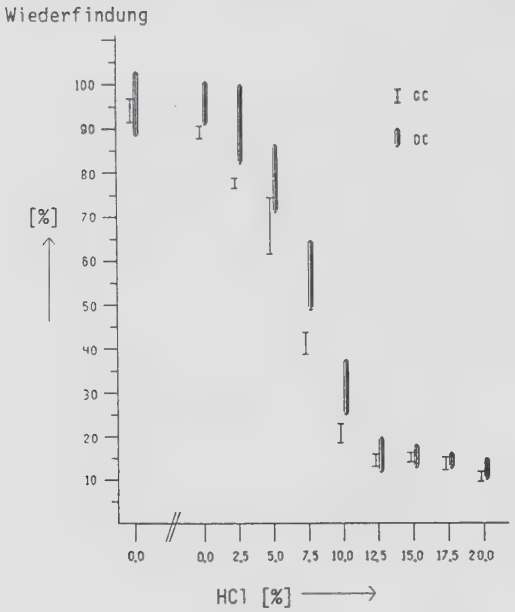


Abb. 32: Wiederfindungsraten von 3 nach Behandlung mit Salzsäure bestimmt durch GC und DC (Methode IV)
(vgl. Fußnote S. 76)

Unter gleichen Bedingungen steigt die Ausbeute an 30 von 0 % mit 0.0 % HCl über 62 bis 65 % mit 12.5 % HCl auf ca. 70 % mit Salzsäurekonzentrationen zwischen 12.5 und 20 % HCl an (Abb. 33).

Die Gesamtwiederfindungsrate (Summe aus 3 + 30) nimmt mit steigender Salzsäurekonzentration von ca. 95 % auf ca. 77 bis 80 % ab und liegt durchschnittlich bei 81.8 % (Abb. 34).

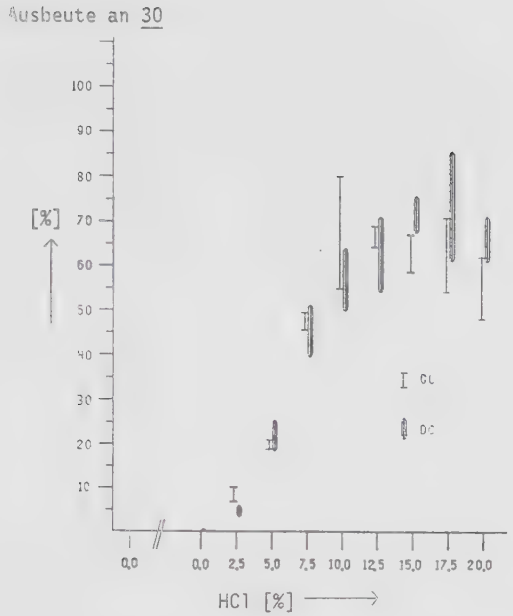


Abb. 33: Ausbeute des Artefaktes 30 nach Behandlung von 3 mit Salzsäure, bestimmt durch GC und DC (Methode IV) (vgl. Fußnote S. 76)

Die Ergebnisse der Methoden I, II und III sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

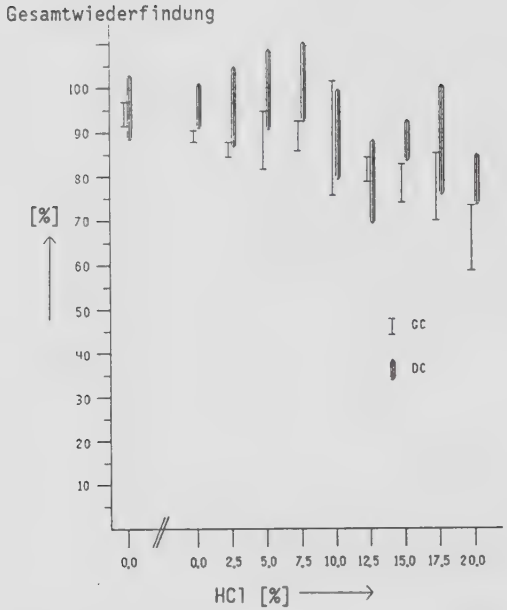


Abb. 34: Gesamtwiederfindungsraten (Summe von 3 + 30) nach Behandlung von 3 mit Salzsäure, bestimmt durch GC und DC (Methode IV) (vgl. Fußnote S. 76)

Tab. 8 : Wiederfindungsrate von 3 und Ausbeute an 30 nach Behandlung von 3 mit Salzsäure

	Gehalt [%] : Methode		
	I	II	III
Aglykon 3	14.4 ± 4.7	15.6 ± 3.9	78.4 ± 7.5
Artefakt 30*	65.0 ± 6.0	62.8 ± 8.5	21.9 ± 3.6
Gesamt 3 + 30*	79.4 ± 7.6	78.4 ± 9.4	100.3 ± 8.3

*berechnet als 3

Bei den Untersuchungen zur Hydrolyse des Pentazocin-glucuronides(6) erreichen die Wiederfindungsraten an unverändertem Pentazocin(3) mit Säurekonzentrationen zwischen 5 und 7.5 % HCl ihr Maximum zwischen 22 und 34 %. Salzsäurekonzentrationen über 12.5 % führen, wie auch beim Aglykon selbst, zu Wiederfindungsraten zwischen 10 und 14 % (Abb. 35).

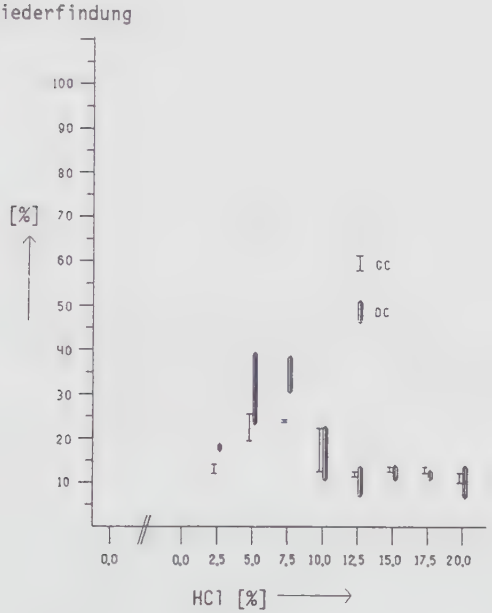


Abb. 35: Wiederfindungsrate von 3 nach Spaltung von 6 mit Salzsäure, bestimmt durch GC und DC (Methode IV) (vgl. Fußnote S. 76)

Mit Säurekonzentrationen von 5 % und mehr steigt die Ausbeute an 30 an und erreicht zwischen 15 und 17.5 % HCl ein Maximum mit Werten zwischen 74 und 79 % (Abb. 36).

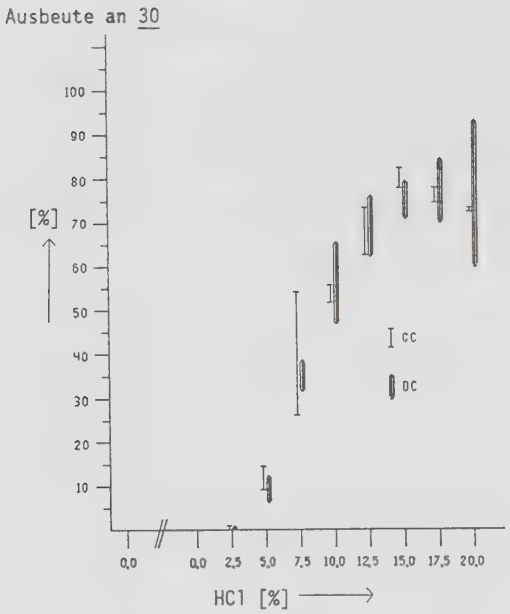


Abb. 36: Ausbeuten des Artefaktes 30 nach Hydrolyse von 6 mit Salzsäure, bestimmt durch GC und DC (Methode IV) (vgl. Fußnote S. 76)

Die Gesamtwiederfindungsrate (Summe von 3 + 30) steigt bei der hydrolytischen Spaltung des Glucuronides 6 zwischen 0 und 15 % HCl kontinuierlich an (Abb. 37). In diesem Bereich führt die Regressionsrechnung zur Abschätzung der zur quantitativen Spaltung notwendigen Salzsäurekonzentration zu einer Geraden (r = 0.995) mit einer Steigung von 6.7 % Hydrolyse/ 1 % HCl, woraus sich für 6 eine minimale Salzsäurekonzentration von 14 bis 15 % errechnet.

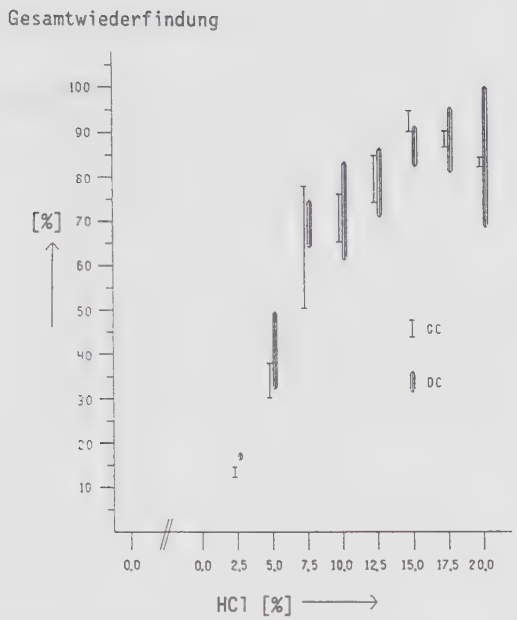


Abb. 37: Gesamtwiederfindungsrate (Summe von 3 + 30) nach Spaltung von 6 mit Salzsäure, bestimmt durch GC und DC (Methode IV) (vgl. Fußnote S. 76)

Die Wiederfindungsraten für die Methoden I, II und III und die daraus errechneten Hydrolyseraten sind in den Tabellen 9 und 10 zusammengefaßt.

Tab. 9 : Wiederfindungsrate von 3 und Ausbeute an 30 nach Behandlung von 6 mit Salzsäure

	Gehalt [%] : Methode		
	I	II	III
Aglykon 3	15.2 ± 6.5	10.1 ± 3.4	31.4 ± 8.2
Artefakt 30*	63.8 ± 10.6	68.9 ± 6.9	9.4 ± 3.1
Gesamt 3 + 30*	79.0 ± 12.4	79.0 ± 7.7	40.8 ± 8.8

*berechnet als 3

Tab. 10: Hydrolyseraten von 6 nach Hydrolyse mit Salzsäure

Hydrolyserate	Methode		
bezogen auf	I [%]	II [%]	III [%]
Aglykon 3	105.6	64.7	40.1
Artefakt 30*	98.2	109.7	42.9
Gesamt 3 + 30*	99.5	100.8	40.7

*berechnet als 3

3 Diskussion der Ergebnisse

Das Verhalten von Glucuroniden und deren Aglyka bei der Hydrolyse mit Salzsäure ist für die Bewertung von Analysenergebnissen in der forensischen Toxikologie von Bedeutung, da die Untersuchung von Urinproben neben anderen Aufarbeitungsschritten eine acidolytische Spaltung von Konjugaten beinhaltet. Aus diesem Grund sollten 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16), 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) und Pentazocin-glucuronid(6) synthetisiert und anschließend mit drei ausgewählten, in der forensischen Analytik häufig genutzten Hydrolysemethoden gespalten werden (Methode I: 20 % HCl, 6 min; Methode II: 12.5 % HCl, 30 min; Methode III: 5 % HCl, 30 min; weitere Bedingungen vgl. Kap. 4.3). Als Maß für die Qualität der einzelnen Hydrolysemethoden dienten die aus den Wiederfindungsraten der Aglyka, den Ausbeuten der Artefakte oder den Gesamtwiederfindungsraten bestimmten Hydrolyseraten (Definitionen siehe Kap. 2.4.1). Der Einfluß der Hydrolysedauer auf die Hydrolyserate wurde nicht untersucht.

Zwei der drei benötigten Glucuronide konnten nach dem Prinzip der Williamson'schen Ethersynthese mit nach Koenigs-Knorr derivatisierter Glucuronsäure synthetisiert werden. 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16) wurde nach Kondensation von 2-Phenyl-propan-1-ol(1) mit Acetylbromglucuronsäuremethylester(8)[20] mit Ag_2CO_3/Celite® nach M. Fetizon[43] als Kondensationsmittel und anschließender alkalischer Hydrolyse der Schutzgruppen in 4 N-NaOH/Aceton in 40 % Ausbeute erhalten. Die Synthese von Pentazocin-glucuronid(6) gelang durch Kondensation von Pentazocin(3) mit Pivaloylbrom-

glucuronsäuremethylester(9)[31] unter gleichzeitiger Hydrolyse der Schutzgruppen in 4 N-NaOH/Aceton.

Nach Abspaltung der Schutzgruppen wurden die Glucuronide 16 und 6 als Bleisalze gefällt und mit bidestilliertem Wasser/ Ethanol (1+1) natriumfrei gewaschen. Das Blei konnte durch Einleiten von H_2S in eine methanolische Aufschlämmung des Bleiglucuronides ohne die Bildung von Nebenprodukten als schwerlösliches Bleisulfid von dem methanollöslichen Glucuronid abgetrennt werden. Unter diesen Bedingungen ließen sich mit ca. 40 % für 16 und ca. 35 % für 6 bessere Ausbeuten erreichen, als dies mit der herkömmlichen Methode möglich war. Diese verläuft über die Abspaltung der Schutzgruppen mit katalytischen Mengen Natriummethylat, Fällung des Bariumglucuronates, Freisetzung des Glucuronides mit H_2SO_4 oder Oxalsäure und anschließende Abtrennung der Nebenprodukte durch präparative DC. Es wurde gezeigt, daß bei jedem dieser Schritte Verluste auftreten können. So wird durch Spuren Wasser der Katalysator Natriummethylat unter Ausbildung eines Acetat/Essigsäure-Puffers inaktiviert, was eine Verminderung der Ausbeute zur Folge hat. Bei der Fällung des Glucuronides als Bariumsalz können durch das CO_2 der Luft Verluste auftreten, da Bariumcarbonat schwerer löslich ist als Bariumglucuronat. Zur präparativen dc Reinigung ist zu bemerken, daß nach deren Durchführung die Ergebnisse der Elementaranalysen der Glucuronide 16 und 6 stark von den theoretischen Werten abwichen. Diese Abweichungen konnten durch die Bildung von Natriumsalzen (ca. 1.5 Mol Na/ Mol Glucuronid) erklärt werden, wobei das Natrium aus der Kieselgelschicht der DC-Platten miteluiert wurde.

Das Glucuronid des tertiären Alkohols 2-Phenyl-propan-2-ol(2) war synthetisch nicht zugänglich, da unter verschiedenen Reaktionsbedingungen 2 zu 2-Phenyl-propen(21) dehydratisierte und durch das freigesetzte Wasser das eingesetzte 1-Halogen-Glucuronsäurederivat verseift wurde. Durch Gabe von Cumol(4) oder 2-Phenyl-propan-2-ol(2) an Mäuse konnte Urin erhalten werden, in dem 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) als Metabolit enthalten war. Die Isolierung und Reinigung gelang wegen der ausgeprägten Thermo- und Säurelabilität der Substanz nicht vollständig[15]. Für die Bestimmungen der Hydrolyserate wurde daher das aus Mäuseurin angereicherte Produkt 22a eingesetzt (Konzentration an 22 in 22a ca. 60 bis 65 %).

Die Stabilitätsuntersuchungen unter Hydrolysebedingungen ergaben für die drei Aglyka 1, 2 und 3 unterschiedliche Ergebnisse. Während sich 2-Phenyl-propan-1-ol(1) in dem untersuchten Bereich unter den angewandten Bedingungen als praktisch säurestabile Substanz erwies, konnten für 2-Phenyl-propan-2-ol(2) und Pentazocin(3) Artefakte nachgewiesen werden. Die Wiederfindungsraten von 1 nehmen mit steigender Säurekonzentration von 99 % auf ca. 90 % ab, ohne daß für 1 ein Artefakt nachgewiesen wurde. Unter gleichen Bedingungen steigen die Wiederfindungsraten von 2 von ca. 40 % auf ca. 48 % an. Hier ist die Artefaktbildung stark ausgeprägt. Durch säurekatalysierte Dehydratisierung des tertiären Alkohols bildet sich das lipophilere 2-Phenyl-propen(21), das durch Dimerisierung, Polymerisation und andere Folgereaktionen weiterreagieren kann. Die quantitativen Bestimmungen dieser Substanz ergaben mit steigender Salzsäurekonzentration eine konti-

nuierliche Abnahme der Ausbeute von ca. 17 % auf ca. 6 %. Die Gesamtwiederfindungsrate als Summe aus 2 und 21 liegt bei durchschnittlich 54 % und ist weitgehend unabhängig von der Salzsäurekonzentration. Für Pentazocin(3) konnte zwischen 0 und 12.5 % HCl bei gleichbleibender Hydrolysedauer eine starke Abnahme der Wiederfindungsraten ermittelt werden, die dann zwischen 12.5 und 20 % HCl bei 10 bis 15 % liegt. Im Gegensatz zu dem Verhalten von 2 wurde bei 3 durch säurekatalysierte Hydratisierung der Dimethylallyl-Seitenkette ein tertiärer Alkohol als Artefakt(30) gebildet. Die Ausbeute des hydrophileren Artefaktes 30 steigt in dem Bereich zwischen 0 und 12.5 % HCl schnell auf ca. 65 % an und erreicht bei weiterer Steigerung der Salzsäurekonzentration zwischen 12.5 % und 20 % Werte von ca. 70 %. Die Gesamtwiederfindungsraten (Summe aus 3 und 30) nehmen mit steigender Salzsäurekonzentration von ca. 95 % auf 77 bis 80 % ab. Beim Vergleich der Ergebnisse von 2 und 3 fällt auf, daß mit steigender Salzsäurekonzentration die Ausbeuten der hydratisierten Verbindungen (2 und 30) zunehmen und die Ausbeuten der dehydratisierten Verbindungen (3 und 21) abnehmen.

Es ist nicht möglich, für die Spaltung von Glucuroniden aufgrund der Wiederfindungsraten der Aglyka eine bestimmte Säurekonzentration zu empfehlen. Die Ergebnisse zeigen, daß für die Hydrolyse von 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16) und Pentazocinglucuronid(6) möglichst schonende und für 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) möglichst drastische Hydrolysebedingungen sinnvoll wären, um maximale Wiederfindungsraten der Aglyka zu erreichen.

Außerdem zeigen die Ergebnisse der salzsauren Hydrolyse der Glucuronide 16, 6 und 22, daß sich die Forderungen nach quantitativer Spaltung der Glucuronide und maximaler Wiederfindung der Aglyka nicht immer in Einklang bringen lassen. Bei 16, das mit 9 bis 10 % HCl quantitativ gespalten wird, werden diese Forderungen noch erfüllt. Für 22 liegen die Säurekonzentrationen, die zur quantitativen Spaltung notwendig sind, bei 1 % HCl. Eine maximale Wiederfindung des Aglykons wird aber erst mit Säurekonzentrationen von 12.5 bis 20 % HCl erreicht. Für Pentazocin-glucuronid(6), das erst mit 14 bis 15 %iger HCl quantitativ gespalten wird, werden bei Säurekonzentrationen von 5 bis 7.5 % HCl maximale Wiederfindungsraten des Aglykons 3 registriert, obwohl in diesem Bereich erst 30 bis 40 % des Glucuronides hydrolytisch gespalten sind.

Bei der Auswahl einer geeigneten Hydrolysemethode sind aufgrund der vorliegenden Ergebnisse drei Möglichkeiten zu berücksichtigen.

Im ersten Fall tritt auch bei höheren Salzsäurekonzentrationen keine Artefaktbildung ein. Mit der quantitativen Spaltung des Glucuronides kann eine maximale Wiederfindungsrate des Aglykons erreicht werden (Beispiel: 16).

Im zweiten Fall nimmt die Aglykonkonzentration mit steigender Säurekonzentration zu, da bei niedrigen Säurekonzentrationen das Gleichgewicht zwischen Aglykon und Artefakt auf der Seite des Artefaktes liegt und sich mit Steigerung der Säurekonzentration in Richtung Aglykon verschiebt (Beispiel: 22).

Als weitere Möglichkeit kann bei Steigerung der Säurekonzentration die Wiederfindungsrate des Aglykons durch Artefaktbildung absinken, wodurch der Nachweis des Aglykons erschwert oder sogar unmöglich wird (Beispiel: 6). In diesem Fall sollten, wenn möglich, die Artefakte identifiziert und in die quantitative Bestimmung mit einbezogen werden. Unter diesen Vorraussetzungen wären auch bei hohen Säurekonzentrationen hohe Gesamtwiederfindungsraten möglich.

Diese Überlegungen setzen jedoch voraus, daß das zu bestimmende Glucuronid bekannt ist und das Verhalten des Aglykons unter Hydrolysebedingungen untersucht worden ist. Da in der forensischen Analytik meist nicht bekannt ist, um welche Verbindung es sich in der zu untersuchenden Probe handelt, soll unter Einbezug der bisher veröffentlichten Untersuchungsergebnisse von S. Goenechea und Mitarb.[6-10] der Versuch unternommen werden, die drei Hydrolysemethoden zu bewerten. Für die drei in der forensischen Analytik üblichen Methoden I, II und III liegen die Ergebnisse von zehn Glucuroniden vor (Tab. 11).

Wegen der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden sind die Ergebnisse der Glucuronidspaltungen in zwei Gruppen unterteilt worden. Die erste Gruppe (1 bis 5) umfaßt die Glucuronide, bei denen die quantitativen Bestimmungen der Aglyka- bzw. Artefaktkonzentrationen nach chromatographischer Trennung der Extrakte durch DC, HPLC oder GC erfolgten. In der zweiten Gruppe (6 bis 10) sind die Glucuronide aufgeführt, die nach der Hydrolyse UV-spektroskopisch, ohne chromatographische Trennung der Extrakte, auf ihren Gehalt an Aglykon untersucht wurden.

Tab. 11: Bisher untersuchte Glucuronide

Nr	Glucuronid	OH-Gruppe
1	2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)	tertiär
2	2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)	primär
3	Pentazocin-glucuronid(6)	phenolisch
4	Morphin-3-glucuronid(29)	phenolisch
5	Codein-glucuronid(28)	sekundär
6	p-Nitrophenol-glucuronid(27)	phenolisch
7	4'-Hydroxy-methaqualon-glucuronid	phenolisch
8	3'-Hydroxy-methaqualon-glucuronid	phenolisch
9	2-Hydroxymethyl-methaqualon-glucuronid	primär
10	2'-Hydroxymethyl-methaqualon-glucuronid	primär

Da die hydrolytisch freigesetzte Glucuronsäure in Gegenwart von Salzsäure eine Vielzahl von Abbauprodukten bilden kann[84-87], die chromophore Gruppen enthalten, ist eine Beeinflussung der quantitativen UV-spektroskopischen Bestimmungen, insbesondere bei höheren Salzsäurekonzentrationen (12.5 % und mehr), für die Aglyka der zweiten Gruppe nicht ganz auszuschließen. Außerdem kann

84) M. S. Feather, J. F. Harris; J. org. Chem., 31, 4018 (1966)

85) E. Stutz, H. Deuel; Helv. Chim. Acta, 41, 1722 (1958)

86) T. Popoff, O. Theander; Carbohyd. Res., 22, 135 (1972)

87) T. Popoff, O. Theander; Acta chem. Scand., B 30, 705 (1976)

unter diesen Bedingungen nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, daß der vermessene Chromophor ausschließlich dem Aglykon zugeordnet werden kann, oder ob die gemessene Extinktion durch teilweise mitextrahiertes intaktes Glucuronid oder Artefakte hervorgerufen wurde. Für p-Nitrophenol-glucuronid(27) konnten die Hydrolyseraten in verschiedenen Labors mit unterschiedlichen Analysemethoden bestätigt werden*.

Zur Interpretation der Ergebnisse (Tab.: 12) müssen für die acidolytische Spaltung der glykosidischen Bindung, die nach dem für Acetale üblichen A-1 - Mechanismus ablaufen sollte[3),88-91)], je nach Struktur des Aglykons zwei unterschiedliche Reaktionsmechanismen angenommen werden (Abb.: 38).

---

* persönliche Mitteil. Prof. Dr. S. Goenechea

88) E. Schmitz, I. Eichhorn; Acetals and Hemiacetals; In: S. Patai; The Chemistry of the Ether Linkage; Wiley Interscience, London, New York, S. 332 (1967)

89) T. H. Lowry, K. Schueller Richardson; Mechanismen und Theorie in der Organischen Chemie; Verlag Chemie, Weinheim 1980

90) R. S. Taegue; Adv. Carbohydr. Chem., 9, 185 (1954)

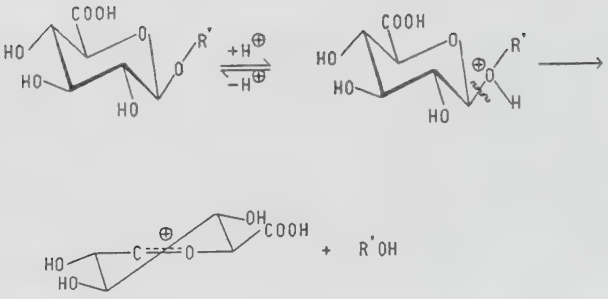
91) O. Theander; The Carbohydrates, 2. Ed., Vol 1b; Academic Press, New York 1980

Tab. 12: Ergebnisse der salzsauren Hydrolyse von zehn Glucuroniden und deren Aglyka mit den Methoden I (20 % HCl), II (12.5 % HCl) und III (5 % HCl)

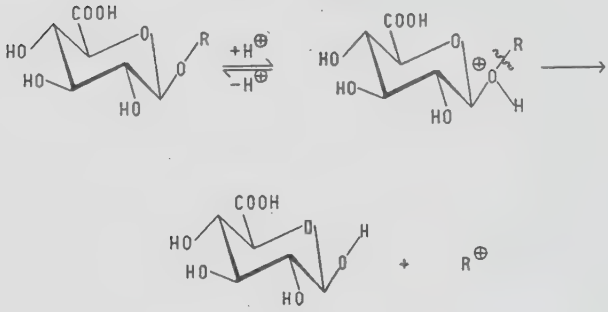
Nr	Substanz	Wiederfindungsraten nach Hydrolyse des Aglykons in [%]			des Glucuronides in [%]			Hydrolyseraten		
		5 %	12.5 %	20 %	5 %	12.5 %	20 %	5 %	12.5 %	20 %
1	Aglykon 2	34.4	43.5	42.7	23.4	26.8	26.5	68.0	61.6	62.1
	Artefakt 21[1]	14.3	5.8	5.6	10.1	6.8	5.0	70.6	117.4	89.3
	Gesamt 2 + 21[1]	48.7	49.3	48.3	33.5	33.6	31.5	68.8	68.2	65.2
2	Aglykon 1	95.1	94.3	88.0	65.7	94.9	86.8	69.1	100.6	98.6
3	Aglykon 3	78.4	15.6	14.4	31.4	10.1	15.2	40.1	64.7	105.6
	Artefakt 30[2]	21.9	62.8	65.0	9.4	68.9	63.8	42.9	109.7	98.2
	Gesamt 3 + 30[2]	100.3	78.4	79.4	40.8	79.0	79.0	40.7	100.8	99.5
4	Morphin	90.6	85.1	72.3	40.5	91.7	86.8	44.7	107.8	120.1
5	Codein	97.6	86.8	80.1	17.4	46.8	91.7	17.8	53.9	114.5
6	p-Nitrophenol	n.b.[3]	n.b.	n.b.	42.3	74.9	85.1	42.3	74.9	85.1
7	4'-Hydroxy-MQ[4]	n.b.	99.7	97.2	18.4	58.2	95.0	18.4	58.4	97.7
8	3'-Hydroxy-MQ	n.b.	98.8	94.4	12.6	52.2	91.6	12.6	52.8	97.0
9	2-Hydroxy-methyl-MQ	n.b.	99.2	97.3	12.3	30.6	92.6	12.3	30.8	95.2
10	2'-Hydroxy-methyl-MQ	n.b.	99.8	98.2	3.3	27.2	94.5	3.3	27.2	96.2

1) berechnet als 2 ; 2) berechnet als 3 ; 3) n.b. = nicht bestimmt, gleich 100 % gesetzt

4) MQ = Methaqualon



Reaktionsmechanismus 1: für Phenole, primäre und sekundäre Alkohole



Reaktionsmechanismus 2: für tertiäre Alkohole

Abb. 38: Reaktionsmöglichkeiten von Glucuroniden bei der Hydrolyse mit Salzsäure

Der Reaktionsmechanismus 1 wurde für die Hydrolyse von Glucuroniden, deren Aglyka phenolische, sekundäre oder primäre OH-Gruppen tragen, nachgewiesen und ist eine Umkehrung der Acetalbildungsreaktion. Reaktionsmechanismus 2 wurde für die Hydrolyse tertiärer Substituenten beschrieben. Da bei den unter-

suchten Glucuroniden der Carbonylteil des Acetals, nämlich die Glucuronsäure, jeweils identisch ist, sind die unterschiedlichen Hydrolyseraten auf die verschiedenen Substituenten am glykosidischen Sauerstoffatom zurückzuführen. Eine Beschleunigung der Hydrolyse kann durch eine erhöhte Polarisierung der glykosidischen Bindung und durch die Verzweigung der Alkylsubstituenten hervorgerufen werden.

Die Hydrolyseraten der Glucuronide 3 bis 10 (Tab. 12) nach Methode III (vgl. Kap. 2.4.1) lassen die Tendenz erkennen, daß phenolische Substituenten leichter abspaltbar sind als sekundäre und primäre Alkylsubstituenten. Die Reaktion von tertiären Alkylsubstituenten nach Reaktionsmechanismus 2 sollte ein energetisch bevorzugter Weg sein. Während für die Bildung des Carbokations am Glucuronsäurerest nach Reaktionsweg 1 eine Konformationsänderung in die energetisch ungünstige Halbsesselkonformation notwendig ist, kann sich das Carbokation tertiärer Alkylsubstituenten leichter stabilisieren. Daß auch diese Reaktion nach dem A1-Mechanismus verläuft, kann mit den sehr hohen Hydrolyseraten von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) belegt werden. Die Hydrolyseraten von 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16), die für einen primären Alkylsubstituenten ungewöhnlich hoch sind, lassen auf Nachbargruppeneffekte schließen, die die Reaktion beschleunigen. Eine Erklärung für die anchimere Beschleunigung bietet die Bildung eines mesomeriestabilisierten Phenoniumkations, das eine Reaktion nach Mechanismus 2 ermöglicht.

Für die Bewertung der drei Hydrolysemethoden I, II und III ergibt sich für die Glucuronide, die nach Reaktionsmechanismus 1 reagieren, folgendes Bild. Mit Methode III (5 % HCl) lassen sich diese Glucuronide nicht quantitativ hydrolysieren, wie die Hydrolyseraten, die zwischen 3 und 45 % liegen, belegen. Mit Methode II (12.5 % HCl) können manche Glucuronide, deren Aglyka phenolische OH-Gruppen besitzen, quantitativ gespalten werden (Morphin- und Pentazocin-glucuronid). Für die quantitative Spaltung von Glucuroniden, deren Aglyka primäre oder sekundäre OH-Gruppen besitzen, reicht diese Säurekonzentration jedoch nicht aus. Ob die Säurekonzentration der Methode I für die Spaltung dieser Glucuronide ausreicht, kann wegen der für die Glucuronide der Gruppe 2 gemachten Einschränkungen nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Glucuronide, die vollständig oder teilweise nach Reaktionsmechanismus 2 reagieren, benötigen weniger drastische Hydrolysebedingungen. So wird das Glucuronid des tertiären Alkohols 2 mit Methode III und das Glucuronid des primären Alkohols 1, das zumindest teilweise nach Reaktionsmechanismus 2 reagiert, mit Methode II quantitativ gespalten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Methode III für allgemeine Screening-Untersuchungen nicht oder nur schlecht geeignet ist. Bei der Entscheidung, ob Methode I oder II angewendet werden soll, spielt die Säurestabilität des Aglykons eine wichtige Rolle, da die Artefaktbildung von der Säurekonzentration abhängig sein kann und durch Erhöhung der Säurekonzentration die Aglykonkonzentration unter die Nachweisgrenze absinken kann. Für die Identifizierung der zu bestimmenden Substanz könnte zunächst mit

Methode II hydrolysiert werden. Danach müßte die identifizierte Verbindung den entsprechenden Hydrolysebedingungen unterworfen werden, damit Artefakte erkannt und bestimmt werden können. Anschließend können dann die quantitativen Bestimmungen durchgeführt werden. Wie problematisch dieser Vorschlag ist, kann am Beispiel Pentazocin(3) gezeigt werden, von dem nach Hydrolyse mit Methode II nur 10 bis 15 % der Ausgangssubstanz wiedergefunden werden können. Dies führte in der Literatur[92,93] zu dem Vorschlag, daß eine hydrolytische Spaltung von Pentazocinglucuronid(6) nicht vorgenommen werden sollte, da das Aglykon zerstört wird.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist es möglich, eine hydrolytische Spaltung von 6 mit Salzsäure durchzuführen, wenn sich die quantitativen Bestimmungen auch auf das Artefakt 30 erstrecken. Dazu ist zu bemerken, daß sich 3 und 30 bei Sreening-Untersuchungen im Fließmittel nach Breiter (Flm. 3; vgl. Kap. 4.1.1) nicht trennen lassen. Die Trennung gelingt in dem von R. W. Reid und Mitarb.[77] beschriebenen Fließmittel 6 (vgl. Kap. 4.1.1).

Zur Analytik der Cumolmetabolite 16 und 22 ist zu sagen, daß die hydrolytisch freigesetzten Aglyka 1 und 2 flüchtig sind und daher die Hydrolysebedingungen und die Aufarbeitung der Hydrolysate diesem Umstand angepaßt werden müssen. Da nur wenig Informationen über den Cumolmetabolismus zu erhalten waren, stellen sich im Zusammenhang mit diesen Untersuchungsergebnissen einige Fragen.

---

92) B. A. Berkowitz, J. H. Asling, S. M. Shnider and E. L. Way; Clin. Pharmacol. Ther., 10, 320 (1969)

93) D. P. Vaughan, A. H. Beckett; J. Pharm. Pharmac., 26, 789 (1974)

1. Kann der Metabolismus von Cumol(4), der von D. Robinson[15] an Kaninchen untersucht wurde, auf den Menschen übertragen werden? Die Metabolisierung von Cumol(4) erfolgt z. B. bei Mäusen nur durch die Bildung von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22). Das Glucuronid des primären Alkohols 2-Phenyl-propan-1-ol(1) konnte nicht nachgewiesen werden.
2. Können die quantitativen Angaben, die D. Robinson zu den einzelnen Metaboliten macht (1 : 25 %; 2 : 40 % und 2-Phenyl-propansäure: 25 %) aufrecht erhalten werden, wenn die Voraussetzungen ein falsches UV-Maximum mit einem zu hohen molaren Extinktionskoeffizienten für 2 beinhalten?
3. Warum bestimmen W. Senczuk und B. Litewka[16] bei ihren Metabolismusuntersuchungen am Menschen nur den Gehalt an 2 und nicht auch den leichter zu bestimmenden Gehalt an 1?
4. Sind die 35 %, die W. Senczuk und B. Litewka[16] als Wiederfindung an 2 angeben, auf die Säurelabilität und damit die Artefaktbildung zurückzuführen? Vergleicht man die Wiederfindungsrate der Methode IV (1 % HCl), die bei ca. 40 % liegt, mit den Ergebnissen von W. Senczuk und B. Litewka[16], die bei der Hydrolyse bei pH 2 (15 min) 35 % an 2 bestimmt haben, so legen diese den Verdacht nahe, daß der Metabolismus von Cumol(4) im Menschen, wie bei den Mäusen beobachtet, nur einen Metaboliten, nämlich 22 aufweist.

Als Alternative zur hydrolytischen Spaltung von Glucuroniden mit Mineralsäuren kann die enzymatische Spaltung mit β-Glucuronidase gewählt werden. Dieses Verfahren hat zwar den Vorteil, daß keine Artefakte gebildet werden, aber auch mehrere Nachteile, die die Anwendung dieser Methode in der Routine ein-

schränken. Bei der großen Vielzahl der in der forensischen Toxikologie möglichen Substanzen ist nicht auszuschließen, daß einige der zu hydrolysierenden Glucuronide nicht oder nur in geringem Umfang gespalten werden[5) 94)]. 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) wurde zum Beispiel von der verwendeten β-Glucuronidase nicht hydrolysiert. Ein weiterer Nachteil ist der große Zeitbedarf, der bei Notfalluntersuchungen eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz zu vielen enzymatischen Reaktionen, die zum Beispiel in der Lebensmittelchemie schnell quantitativ ausgewertet werden können, ist der Zeitbedarf der β-Glucuronidasespaltung sehr stark vom Substrat abhängig. So konnten für p-Nitrophenol-glucuronid(27) mit 1.5 Stunden, für 16 mit 11 Stunden und für 6 mit 44 Stunden sehr große Unterschiede in den Halbwertszeiten ermittelt werden, die gegen die Verwendung von β-Glucuronidase zur Hydrolyse von Glucuroniden in der forensischen Routineanalytik sprechen. Die Unsicherheit in der Wahl der richtigen Hydrolysezeit kann am Beispiel Pentazocin-glucuronid(6) deutlich gemacht werden. So wurden in der Literatur[95-97)] Angaben zur Inkubationszeit gemacht, die von "über Nacht" über 48 Stunden bis zu 72 Stunden reichten, wobei die Reaktionsbedingungen wie Temperatur und pH-Wert der Lösung gleich waren. Es gibt zwar die Möglichkeit den Gehalt rechnerisch

---

94) J. Goto. A. Sato, K. Suzaki, T. Nambara; Chem. Pharm. Bull., 29, 1975 (1981)

95) K. Fukawa, O. Irino, K. Maruyama, Y. Ohsawa and K. Saitoh; Chem. Pharm. Bull., 27, 578 (1979)

96) K. A. Pittman, D. Rosi, R. Cherniak, A. J. Merola and W. D. Conway; Biochem. Pharmacol., 18, 1673 (1969)

97) K. A. Pittman; Biochem. Pharmacol., 19, 1833 (1970)

aus zwei Meßwerten, die zu unterschiedlichen Zeiten aufgenommen werden, zu ermitteln, dies setzt jedoch voraus, daß das Aglykon bekannt ist und die Nachweisgrenze schnell überschritten wird.

Bei den für die Spaltung von Konjugaten geschilderten Schwierigkeiten stellt sich die Frage, ob es nicht sinnvoller wäre die Identifizierung von Arzneimittelkonjugaten direkt, das heißt, ohne Spaltung durchzuführen. Diese direkte Identifizierung wäre nach Anreicherung der Konjugate mit Reversed-Phase- Extraktionsmaterial (z. B.: Bond-Elut®-RP_{18}) möglich. Der Nachweis der Arzneimittelkonjugate könnte dann durch Kombinationstechniken wie DC/MS oder HPLC/MS erfolgen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Angaben zu den verwendeten Geräten und Chemikalien

4.1.1 Zur Messung verwendete Geräte

1. UV-Spektren: Unicam – Leitz SP 800 B (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar); Perkin Elmer 550 SE UV/VIS Spektrophotometer (Bodenseewerk Perkin Elmer & Co. GmbH, Überlingen)

2. IR-Spektren: Perkin Elmer Spektrophotometer Modell 221 und Modell 298 (Bodenseewerk Perkin Elmer & Co. GmbH, Überlingen)

3. ^{1}H-NMR-Spektren: WH 90 (Bruker, Analytische Meßtechnik GmbH, Rheinstetten) 90 MHz

4. Massenspektren (bzw. GC/MS): Finnigan/MAT 212 und Datensystem SS 188 (Finnigan MAT GmbH, Bremen)(EI und CI/NH_3MS)
   MS 30 A.E.I (Kratos, Manchester, GB)
   VG-Micromass 7053 (Vacuum Generators Instruments Inc., Manchester, GB) (FABMS)
   VG ZAB 1F (Vacuum Generators Instruments Inc., Manchester, GB) (NIFABMS (Thioglycerol))
   Finnigan/MAT 8230 und Datensystem SS 300 (Finnigan MAT GmbH, Bremen) (NIFABMS (Glycerin, Triethanolamin))

5. GC-Geräte: DANI 3400 für gepackte Säulen und DANI 3900 für Kapillarsäulen (DANI Analysentechnik Vertriebsgesellschaft mbH, Mainz-Kastel) mit Shimadzu Chromatopac C-R2A(X) - Integrator (Shimadzu Corporation, Tokyo), Perkin Elmer-GC-Automat Multifract F40 (Bodenseewerk Perkin Elmer & Co. GmbH, Überlingen) mit Spektra-Physics Autolab Integrator (Spektra-Physics-GmbH, Darmstadt)

6. HPLC-Gerät: Hewlett Packard 1010A Liquid Chromatograph mit UV-Detektor (variable Wellenlänge) (Hewlett Packard GmbH, Waldbronn) und Shimadzu C-R1B Chromatopac Integrator (Shimadzu Corporation, Tokyo)

7. TLC/HPTLC Scanner 76510 (Camag, Muttenz, CH) mit Spectra-Physics SP 4270 Integrator (Spekta-Physics-GmbH, Darmstadt)

8. Schmelzpunktbestimmung: Heiztischmikroskop (Reichert, A)

9. Dünnschichtchromatographie

   präparative Trennungen

   DC-Fertigplatten (E. Merck, Darmstadt)

   Kieselgel 60 F_{254}, Schichtdicke 2 mm (20 x 20 cm)

   analytische Trennungen

   DC-Fertigplatten (E. Merck, Darmstadt)

   Kieselgel 60 F_{254}, Schichtdicke 0.25 mm

   (20 x 20 cm; 20 x 10 cm; 5 x 10 cm)

   quantitative Bestimmungen

   HPTLC-Fertigplatten (E. Merck, Darmstadt)

   Kieselgel 60 F_{254}, für die Nano-DC (10 x 10 cm)

Kammern

vertikale aufsteigende Chromatographie in Desaga - Trögen (Desaga GmbH, Heidelberg); lineare Chromatographie in HPTLC-Linear-Kammern von Camag (Camag, Muttenz, CH)

Verwendete Fließmittelsysteme:

Flm. 1: Chloroform/Aceton (4 + 1)

Flm. 2: Butanol/Aceton/Essigsäure/NH_4OH 25 %/H_2O (45 + 15 + 10 + 2 + 28)

Flm. 3: Chloroform/Methanol/NH_4OH 25 % (90 + 10 + 1)

Flm. 4: Butanol/Essigsäure/Wasser (4 + 1 + 5)

Flm. 5: Isopropanol/Essigsäure/Essigester/Wasser (5 + 3 + 15 + 8)

Flm. 6: Hexan/Essigester/Ethanol/NH_4OH 25 % (45 + 50 + 5 + 2)

Verwendete Sprühreagenzien:[54)]

Sprühm. 1: Anisaldehyd/Schwefelsäure für Zucker, Steroide und Terpene

Sprühm. 2: Dragendorffs-Reagenz nach Thies und Reuther für Alkaloide und andere stickstoffhaltige Verbindungen

Sprühm. 3: Eisen(III)-chlorid für Phenole und Hydroxamsäuren

Sprühm. 4: Kaliumiodplatinat für Alkaloide und andere organische Stickstoffverbindungen

Sprühm. 5: Naphthoresorcin/Phosphorsäure für Zucker

Fluoreszenzinduzierendes Tauchbad für die quantitative Pentazocin - Bestimmung:

10 ml 1 % $K_3[Fe(CN)_6]$ + 10 ml 4 N-NaOH werden in 80 ml Wasser gelöst und auf 500 ml mit Methanol verdünnt.

10. Säulenchromatographie

präparative Säulenchromatographie

Kieselgel 60 (E. Merck, Darmstadt),

Korngröße 0.063 - 0.200 mm (70 - 230 mesh ASTM)

präparative Niederdrucksäulenchromatographie

Lobar®-Fertigsäule, Größe B, belegt mit

Lichroprep® RP-8, 40 - 63 µm (E. Merck, Darmstadt)

Präparative HPLC

Lichroprep® RP-8 (40 - 63 µm) (E. Merck, Darmstadt)

Lichroprep® RP-18 (40 - 63 µm) (E. Merck, Darmstadt)

Qualitative und quantitative HPLC

Lichrosorb® RP-8 125-4 (5 µm) (E. Merck, Darmstadt)

Lichrosorb® RP-18 125-4 (5 µm) (E. Merck, Darmstadt)

Lichrosorb® RP-18 250-4 (5 µm) (E. Merck, Darmstadt)

Spherisorb® 5 ODS II 125*5 (Kontron Analytik GmbH,Düsseldorf)

11. Ionenaustauschersäule

Leere Lobar®-Säule Typ B mit Ionenaustauscherharz gefüllt (ca. 110 g) Ionenaustauscherharz von Serva (Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg), Type: 50 WX 8 (200 - 400 mesh); Gegenion: H^+ p.A.

12. Extraktionsmittel

Baker® Octadecyl(C_{18}) - Extraktionssäulen (6 ml)

(J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ, USA)

Sep-Pak®-RP_{18} - Extraktionssäulen (1 ml)

(Waters Associates, Inc., Milford, Ma, USA)

Extrelut® - Säulen (20 ml) (E. Merck, Darmstadt)

Die Elementaranalysen wurden im Chemischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn bzw. im Mikroanalytischen Laboratorium Dr. F. Pascher, Bonn, ausgeführt.

4.1.2 Verwendete Chemikalien

1. 2-Phenyl-propan-1-ol(1)

Für die Synthesen wurde das Racemat verwendet.

Hersteller: EGA-Chemie (Aldrich Company, GmbH & Co. KG, Steinheim)

UV-Spektrum : (Methanol) λ_{max} (ϵ) = 258 (188) nm

Lit.[15] : (Methanol) λ_{max} (ϵ) = 258 (210) nm

IR-Spektrum (Film): 3600 - 3100 (-OH), 3110, 3080, 3060, 3025 (Aromat.), 2960, 2930, 2870 (ges. CH), 1950, 1870, 1805, 1745 (aromat. Oberschw.), 1600, 1580, 1490 (Aromat), 1070 - 1010 (-C-O-), 760, 700 (monosubst. Aromat) cm^{-1}

^1H-NMR (90 MHz) $CDCl_3$, TMS : δ(ppm)= 7.47 - 7.09 (m, 5H, Aromat), 3.65 (t, 2H, $-CH_2-CH-CH_3$, J = 6-7 Hz), 2.92 (sext, 1H, $-CH-CH_3$, J = 6-7 Hz), 1.55 (s, 1H, -OH), 1.25 (d, 3H, $CH-CH_3$, J = 6-7 Hz)

Massenspektrum EI, 50°C : m/e(%)= 136(18), 118(10), 117(12), 105(100), 91(12), 79(12), 44(48)

2. 2-Phenyl-propan-2-ol(2)

Hersteller: EGA-Chemie (Aldrich Company, GmbH & Co KG, Steinheim)

UV-Spektrum : (Methanol) λ_{max} = 257 nm

Lit.[15] : (Methanol) λ_{max} (ϵ) = 247 (558) nm

IR-Spektrum (Film): 3600 - 3150 (-OH), 3080, 3050, 3020 (Aromat), 2985, 2920, 2880 (ges. CH), 1945, 1870, 1800 (arom. Oberschw.), 1600, 1490 (Aromat), 1140 - 1000 (-C-O-), 760, 700 (monosubst. Aromat) cm^{-1}

^1H-NMR (90 MHz) $CDCl_3$, TMS : δ(ppm)= 7.60 - 7.20 (m, 5H, Aromat), 1.90 (s, 1H, -OH), 1.55 (s, 6H, 2x $-CH_3$)

Massenspektrum EI, 50°C : m/e(%)= 118(100), 103(42), 91(15), 78(30)

3. 2-Phenyl-propen(21)

Hersteller: EGA-Chemie (Aldrich Company, GmbH & Co KG, Steinheim)

UV-Spektrum : (Methanol) λ_{max} (ε)= 242 (10200) nm Lit.[15]

IR-Spektrum (Film): 3120, 3090, 3060, 3035, 3010 (Aromat), 2980, 2950, 2920, 2870 (ges. CH), 1950, 1870, 1800 (aromat.Oberschw.), 1630 (-C=C-), 1600, 1570, 1490 (Aromat), 890 ($-C=CH_2$), 775 (monosubst. Aromat) cm^{-1}

Massenspektrum EI, 50°C : m/e(%)= 118(100), 103(58), 91(22), 78(42)

4. Pentazocin(3)

Für die Synthesen wurde aus Ampullen extrahierte Base und von der Firma Winthrop (Neu Isenburg) zur Verfügung gestellte freie Base verwendet.

^{1}H-NMR (90 MHz) : δ(ppm)= 6.93 - 6.53 (m, 4H, 3 Aromat, Ar-OH),
$CDCl_3$, TMS 5.27 (t, 1H, -N-CH_2-C$\underline{H}$=C-, J = 8 Hz), 3.18 - 1.74 (m, 9H, 2x -N-CH_2- , -N-CH- , Ar-C$\underline{H}_2$-CH-, -C-C$\underline{H}_2$-CH_2-N), 1.64 (d, 6H, -C=C-$(CH_3)_2$, J = 3 Hz), 1.38 - 1.20 (m, 1H, -C$\underline{H}$-CH_3), 1.28 (s, 3H, -C-CH_3), 0.82 (d, 3H, -CH-C$\underline{H}_3$, J = 6 Hz)

Massenspektrum : m/e(%)= 285(43), 270(21), 230(14), 217(86),
EI, 65°C 202(24), 110(35), 70(55), 45(100)
vgl. mit Lit.[98]

5. Benzylalkohol

99 %, für die Chromatographie (E. Merck, Darmstadt)

6. Glucuronsäure-γ-lacton

99 %, von EGA-Chemie (Aldrich Company, GmbH & Co KG, Steinheim)

7. Essigsäureanhydrid

p.A. (E. Merck, Darmstadt)

8. Pivalinsäurechlorid

97 %, von EGA-Chemie (Aldrich Company, GmbH & Co KG, Steinheim)

---

98) M. I. Schaffer, R.- L. Lin, N. B. Wu Chen, C. Trojan, S. Teas, R. J. Stein; J. Forensic Sci., 28, 489 (1983)

9. Silbernitrat; p.A. (E. Merck, Darmstadt)
10. ß-Glucuronidase; 188.803 Fishman Units/g (Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg)
11. HBr(33 %) in Eisessig; p.A. (E. Merck, Darmstadt)
12. 2-Amino-5-chlor-benzophenon
13. Celite®; (Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg)

Die verwendeten Lösungsmittel waren entweder p.A., für die Chromatographie, für die Spektroskopie oder sie wurden vor Gebrauch destilliert.

4.2 Synthesevorschriften

4.2.1 Substanzen nach Literaturvorschriften

Folgende Substanzen wurden nach Literaturvorschriften dargestellt:

1. Silbercarbonat Lit.: 99)
2. Silbercarbonat auf Celite® Lit.: 43)
3. 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-ß-D-glucopyranuronsäure-methylester(7) Lit.: 20)
4. 1-Brom-1-desoxy-2,3,4-tri-O-acetyl-α-D-glucopyranuronsäure-methylester(8) Lit.: 20)
5. 1,2,3,4-Tetra-O-pivaloyl-ß-D-gluco-pyranuronsäure-methylester(23) Lit.: 31)
6. 1-Brom-1-desoxy-2,3,4-tri-O-pivaloyl-α-D-glucopyranuronsäure-methylester(9) Lit.: 31)

---

99) M. L. Wolfrom, D. R. Lineback; Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 2, Academic Press, New York, London (1963)

4.2.2 Synthese von 2-Phenyl-propan-1-β-D-(2,3,4-tri-O-acetyl-glucopyranuronsäuremethylester) (13)

10.0 g (73.5 mmol) 1 wurden in einem 1l Dreihalskolben mit Rückflußkühler, Tropftrichter und Destillationsbrücke in 500 ml Toluol gelöst und unter Lichtausschluß zum Sieden erhitzt. Diese Lösung versetzte man über einen Zeitraum von 14 h mit 30 g (75.6 mmol) 8 in 750 ml Toluol und alle 15 min mit 0.5 bis 1 g Silbercarbonat auf Celite® nach M. Fetizon[43]. Die Reaktionsbedingungen wurden so gewählt, daß während der 14 h ca. 750 ml Toluol aus dem Reaktionsgefäß abdestillierten. Nach beendeter Reaktion wurde das Reaktionsgemisch filtriert, der Rückstand mit Chloroform nachgespült und die vereinigten Extrakte im Vakuum eingeengt. Das hochviskose Produkt wurde in Chloroform aufgenommen, mit 0.1 N-NaOH und Wasser gewaschen und im Vakuum eingeengt. In Ether aufgenommen kristallisierte über Nacht im Tiefkühlschrank ein großer Teil des gebildeten Produktes aus. Die Etherphase wurde abdekantiert, im Vakuum eingeengt und in wenig Toluol aufgenommen auf eine Kieselgelsäule (450 x 30 mm) gegeben. Diese wurde solange mit Toluol eluiert, bis im Eluat kein 1 mehr nachweisbar war. Anschließend wurde mit Chloroform das gebildete Produkt von der Säule eluiert. Nach Einengen der Chloroformphase im Vakuum wurde das Produkt über Nacht im Tiefkühlschrank aus Ether kristallisiert. Die vereinigten Kristallisate wurden noch 2x aus Ether umkristallisiert.

Ausbeute : 16.4 g (50 % d. Th.)

Schmelzpunkt : 127 - 129 °C (Ether)

: 123 - 124 °C (Ethanol) Lit[15)]

Elementaranalyse : C_{22} H_{28} O_{10} (Mol.-Masse: 452.2)

Ber.: C 58.4, H 6.24

Gef.: C 58.7, H 6.16

UV-Spektrum : (Methanol) λ_{max} = 258 nm

IR-Spektrum (KBr) : 3080, 3060, 3030 (Aromat), 2950, 2920, 2870, 2850 (ges. CH), 1765, 1750 (C=O), 1600, 1490 (Aromat), 1100, 1045 (C-O), 760, 700 (monosub. Aromat) cm^{-1}

^1H-NMR (90 MHz) : δ(ppm)= 7.47 - 7.09 (m, 5H, aromat. H), 5.27 (dd, 2H, O-C<u>H</u>$_2$-CH-, J = 7 Hz), 5.33 - 4.87 (m, 1H, H_b), 4.49 (t, 1H, H_a, J = 8 Hz), 4.17 - 3.94 (m, 2H, H_c und H_d), 3.76 (s, 3H, -CO-O-C<u>H</u>$_3$), 3.63 - 3.38 (m, 1H, H_e), 3.22 - 2.83 (m, 1H, -O-CH$_2$-C<u>H</u>-CH$_3$), 2.02 (s, 6H, 2x -O-CO-C<u>H</u>$_3$), 1.87 (d, 3H, -O-CO-CH$_3$, J = 14 Hz), 1.27 (dd, 3H, -CH-C<u>H</u>$_3$, J = 7 Hz)

$CDCl_3$, TMS

Massenspektrum : m/e(%)= 452(0.02), 393(0.3), 333(8), 317(20) 257(24), 245(6), 231(10), 215(14), 197(22), 155(84), 127(56), 119(83), 118(84), 91(81), 43(100)

EI, 70 °C

4.2.3 2-Phenyl-propan-1-β-D-glucopyranuronsäure(16)

0.997 g (2.2 mmol) 2-Phenyl-propan-1-β-D-(2,3,4-tri-O-acetyl-glucopyranuronsäuremethylester)(13) wurden in 4.0 ml Aceton gelöst und mit 2.0 ml 4 N-NaOH versetzt. Unter Rühren wurde das Aceton bei Raumtemperatur mit Stickstoff abgeblasen. Ausgefallene Kistalle wurden wieder in Aceton gelöst und das Aceton mit Stickstoff abgeblasen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die Natronlauge-Lösung farblos und klar war (pH-Wert: 13). Mit 1.0 ml Essigsäure (100 %) wurde der pH-Wert auf 5 gesenkt. Diese Lösung wurde mit dest. Wasser auf 50 ml verdünnt und mit 1.5 g basischem Bleiacetat versetzt. Aus der klaren Lösung fällte man das Bleisalz des Glucuronides durch Zugabe von 25 % Ammoniaklösung (pH-Wert: ca. 7). Nach Zugabe von 10 ml Ethanol und 1h Stehenlassen bei + 4°C wurde der Niederschlag abzentrifugiert und mit Wasser/Ethanol (1+1) solange gewaschen, bis die Waschflüssigkeit natriumfrei war. Der Niederschlag wurde in 200 ml Methanol suspendiert und 6 h mit Schwefelwasserstoff begast. Der Bleisulfid-Niederschlag wurde abfiltriert und die methanolische Lösung im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in 5 ml bidest. Wasser aufgenommen und durch einen Milli-pore® -Filter klar filtriert. Das Produkt wurde durch Gefriertrocknung in eine feste Form übergeführt.

Ausbeute : 594 mg (86 % d. Th.)

Elementaranalyse : $C_{15}H_{20}O_7$ (Mol.-Masse: 312.3)

Ber.: C 57.7, H 6.45

Gef.: C 57.9, H 6.76

UV-Spektrum : (Methanol) λ_{max} (ϵ) = 258 (81) nm

IR-Spektrum : Abb. 12

^{1}H-NMR : Abb. 13

Massenspektrum : Abb. 14; NIFABMS
Abb. 15; CI/NH_3MS

4.2.4 Versuchsanordnung für die Biosynthese von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) durch Mäuse

Die Versuche wurden unter Anleitung von Herrn Dr. F. Köhler im Institut für Humangenetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt.

Die Metabolismusuntersuchungen der Substanzen Cumol(4) und 2-Phenyl-propan-2-ol(2) wurden mit Mäusen vom SWS- und NMRI-Stamm (Gewicht: 30 bis 42 g) durchgeführt. Die Versuchstiere stammten aus der Süddeutschen Versuchstierfarm GmbH & Co. KG (Tutlingen).

Während der Versuche betrug die Raumtemperatur 23 °C ± 0.8 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 60 %. Durch eine Zeitschaltuhr wurde für einen 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus mit halbstündiger Dämmerphase vor Tagesbeginn und nach Tagesende gesorgt. Je 10 Versuchstiere wurden in einem Stoffwechselkäfig gehalten, der täglich gereinigt wurde.

Die Substanzen 2-Phenyl-propan-2-ol(2) und Cumol(4) wurden den Versuchstieren durch Aufträufeln auf das Standarddiätfutter Altromin 1311 (Fa. Altromin GmbH, Lage) angeboten.

Tab. 13: Gabe von Cumol(4) an 10 männliche SWS-Mäuse

Tag	angebotenes 4 [ml]	ausgeschiedene Harnmenge [ml]	neue Substanz	Bemerkung
1	1.5	42	+	Harn: rötlich, trüb
2	0.3	45	+	Harn: rötlich, trüb
3	---	30	+	Harn: rötlich, trüb*
4	---	31	-	Harn: rot
5	---	15	-	Harn: dunkelrot
6	---	15	-	Harn: dunkelrot**

* Während der Nacht kam es zu Kannibalismus, daher wurde das Futter wieder auf Normaldiät umgestellt.

**Die Tiere sind stark abgemagert, haben ein gesträubtes Fell und sitzen dicht zusammengedrängt.

Obduktionsbefund:

Schlund und Magen:		hell, geschrumpft
Leber	:	hell, verhärtet
Niere	:	hell, geschrumpft
Blase	:	entzündet, geschrumpft

Tab. 14: Gabe von 2-Phenyl-propan-2-ol(2) an 10 männliche NMRI-Mäuse

ag	angebotenes 2 [ml]	ausgeschiedene Harnmenge [ml]	neue Substanz	Bemerkung
1	0.5	50	+	
2	0.5	50	+	
3	0.5	50	+	Hälfte des Futters noch vorhanden *
4	---	70	+	**
5	---	50	-	
6	---	25	-	Tiere erholen sich

* Die Tiere haben ein gesträubtes Fell und sitzen dicht zusammengedrängt im Käfig

**Während der Nacht kam es zu Kannibalismus, daher wurde das Futter auf Normaldiät umgestellt.

Tab. 15: Gabe von 2-Phenyl-propan-2-ol an 10 weibliche NMRI-Mäuse

Tag	angebotenes 2 [ml]	ausgeschiedene Harnmenge [ml]	neue Substanz	Bemerkung
1	0.5	15	+	
2	1.0	18	+	Hälfte des Futters noch vorhanden
3	---	28	+	
4	0.5	14	+	
5	0.5	20	+	
6	0.5	20	+	
7	0.5	26	+	
8	0.5	26	+	
9	0.5	21	+	
10	---	19	+	
11	---	19	-	

4.2.5 Anreicherung von 2-Phenyl-propan-2-β-D-glucopyranuronsäure(22) aus Mäuseurin

Der tiefgefrorene Mäuseurin wurde in Portionen von 50 bis 80 ml gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde im Ultraschallbad 6 mal mit je 10 ml Methanol extrahiert. Nach Filtration der vereinigten Methanolextrakte und Zugabe von 0.5 ml konz. Ammoniaklösung konzentrierte man die Lösung im Vakuum bei 25°C Wasserbadtemperatur auf ein Volumen von ca. 10 ml. Zu dieser Lösung gab man unter Rühren 50 ml eines Gemisches von Ether/Petrolether (40 bis 65°C) (1+1). Es fiel ein Niederschlag aus, in dem unter Anderem ein großer Teil des 2-Phenyl-propan-2-glucuronides(22) enthalten war. Nach 3 Tagen Stehenlassen bei -18°C dekantierte man die überstehende Lösung ab. Dieser Vorgang (Lösen in 10 ml Methanol + 0.5 ml konz. Ammoniaklösung, Zugabe von 50 ml Ether/Petrolether(1+1), Stehenlassen für 3 Tage) wurde noch einmal wiederholt. Der Rückstand wurde in 10 ml Ethanol suspendiert, mit 0.2 ml konz. Ammoniaklösung versetzt und mit Aktivkohle für eine halbe Stunde bei 40°C Wasserbadtemperatur behandelt. Nach Zentrifugation und Filtration durch einen Milli-Pore®-Filter wurde die Lösung langsam aus einer Bürette mit Ether/Petrolether (1+1) versetzt, bis erste Harnbegleitstoffe ausfielen. Die Lösung wurde für 24 h in einen Tiefkühlschrank gestellt und dann abfiltriert. Nach Aufwärmen Lösung auf Raumtemperatur gab man aus der Bürette wieder soviel des Ether/Petrolether-Gemisches zu, bis eine Fällung auftrat. Diesen Vorgang von Fällung, Kühlen im Gefrierschrank, Filtration und Fällung wiederholte man solange, wie in der Fällung kein oder

nur Spuren des gewünschten Glucuronides durch dc-Untersuchung nachweisbar war (4 bis 6 mal). Die Fällungen waren zunächst schmierig gelb und zum Schluß kristallisierten weiße Nadeln (vermutlich Harnstoff) aus.

Dann gab man zu dieser Lösung 0.2 ml konz. Ammoniaklösung und engte sie im Vakuum bis zur Trockne ein. Nach Aufnahme in 5 ml absol. Methanol wurde das Glucuronid durch langsames Zutropfen von Ether/Petrolether (1+1) gefällt. Die Fällung wurde noch 2 mal wiederholt und man erhielt ein Rohprodukt 22a, das nach dc- und hplc- Untersuchung sauber war (DC: Flm. 2, 4 und 5; Sprühm. 1 und 5; vgl. Kap. 4.1.1; HPLC: Säule: Lichrosorb® 125-4 (5µm), Fließmittel: 20 % Acetonitril/Methanol (1+1), 80 % 0.2 M-KH_2PO_4; 1 ml/min; UV-Detektion bei 258 nm und 212 nm).

Ausbeute aus 80 ml Harn: 126 mg 22a

Bei einem Versuch konnten aus einem Aufarbeitungsgang aus 75 ml Mäuseurin nach dünnschichtchromatographischer Reinigung 2.6 mg reines, kristallines Produkt 22 erhalten werden, und zwar aus einem Gemisch von Methanol, Ether, Petrolether und Essigester, nicht genau bekannter Zusammensetzung, das 3 Monate bei Raumtemperatur verschlossen im Labor stand. Dieser Vorgang konnte leider nicht wiederholt werden.

UV-Spektrum (22a): (Methanol) λ_{max} = 257 nm

IR-Spektrum (KBr) : Abb. 17

^1H-NMR : Abb. 18

Massenspektrum : Abb. 19; NIFABMS

Abb. 20; CI/NH_3MS

4.2.6 Synthese von Pentazocin-β-D-glucopyranuronsäure(6)

Zu einer Lösung von 600 mg (2.1 mmol) Pentazocin(3) in 1 ml 4 N-NaOH gab man unter Rühren und Erhitzen im Wasserbad auf 40 °C 2 g 1-Brom-1-desoxy-2,3,4-tri-O-pivaloyl-α-D-glucopyranuronsäure-methylester(9) in 6 ml Aceton. Durch Zugabe von Aceton und konz. NaOH (32 %) wurden die Reaktionspartner in Lösung gehalten. Es wurden insgesamt 7 g 9 in Aceton über 8 Tage zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Nach beendeter Reaktion wurde die alkalische wäßrige Lösung mit Wasser auf 200 ml aufgefüllt und nach Einstellen mit Essigsäure auf pH 8.5 wurde mit Dichlormethan das nicht umgesetzte Pentazocin(3) extrahiert. Die wäßrige Lösung ließ man nach Auffüllen mit Wasser auf 1 l auf + 4°C abkühlen. Mit einer Duramat-Dosierpumpe (Chemie und Filter GmbH, Heidelberg) wurde die Lösung über eine mit Ionenaustauscherharz gefüllte Lobar®-Säule Typ B (110 g Austauscherharz, H-Form) gegeben und mit 1 l + 4°C warmen dest. Wasser nachgewaschen. Das Produkt wurde mit 4 l 0.15 N wäßriger Ammoniaklösung von der Säule eluiert. Die Anreicherung des Produktes erfolgte mit Sep-pac®-RP_{18}-Säulen und Elution mit Methanol. Erhalten wurden nach Einengen der methanolischen Lösung im Vakuum 452 mg (0.98 mmol) dc- und hplc- reines Rohprodukt (Bedingungen vgl. S. 129) (Elementaranalyse: Ber.. C 65.1, H 7.65, N 3.0; Gef.: C 45.9, H 5.78, N 1.7).

100 mg des erhaltenen Rohproduktes wurden in 20 ml dest. Wasser gelöst, mit Essigsäure auf pH 5 eingestellt und mit 0.5 g basischem Bleiacetat versetzt. Durch Zugabe von konz. Ammoniaklösung konnte das Bleisalz des Glucuronides gefällt werden (pH 7 bis 8).

Nach Zugabe von 5 ml Ethanol und 1 h Stehen bei + 4°C wurde der Niederschlag abzentrifugiert und solange mit bidest. Wasser/Ethanol (1+1) gewaschen, bis die Waschlösung natriumfrei war. Anschließend wurde der Niederschlag in 50 ml Methanol suspendiert und 6 h mit Schwefelwasserstoff versetzt. Das Bleisulfid wurde abfiltriert, die methanolische Lösung im Vakuum eingeengt und der Rückstand in 3 ml bidest. Wasser aufgenommen. Nach Filtration durch einen Milli-Pore®- Filter wurde die wäßrige Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute : 72 mg (35 % d. Th.)

Elementaranalyse : C_{25} H_{35} NO_7 (Mol.-Masse: 461.6)
Ber.: C 65.1, H 7.65, N 3.0
Ber.: C 62.6, H 7.72, N 2.9 (* 1 H_2O)
Gef.: C 62.6, H 7.84, N 3.0

UV-Spektrum : (Methanol) λ_{max} (ϵ) = 275 (1300) nm;
(0.1 N-HCl) λ_{max} = 273 nm
(0.1 N-NaOH) λ_{max} = 275 nm

IR-Spektrum : Abb. 22

^{1}H-NMR : Abb. 23

Massenspektrum : Abb. 24; NIFABMS
Abb. 25 CI/NH_3MS

4.2.7 Darstellung von hydroxyliertem Pentazocin(30)

85 mg (0.3 mmol) Pentazocin(3) in 30 ml Salzsäure (37 %) gelöst wurden 30 min gekocht. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde sie mit NaOH auf pH 8.5 eingestellt und mit Dichlormethan/Isopropanol (9+1) ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum eingeengt und durch präparative DC getrennt (Flm. 6). Die Atmosphäre im Fließmitteltrog war durch Einstellen eines mit konz. Ammoniakwasser gefüllten Becherglases mit Ammoniak gesättigt. Bei der Trennung ergaben sich zwei Hauptfraktionen: unverändertes Pentazocin(3) (R_f= 0.57) und Produkt 30 (R_f= 0.37).

Ausbeute : 65.2 mg (73 % d. Th.)

IR-Spektrum (KBr) : 3600 - 2000 (-OH, phenol.,aliph.), 3060, 3020 (Aromat), 2970, 2920, 2840 (ges. CH), 1615, 1585, 1500 (Aromat) cm^{-1} (vgl. Lit.[78])

^{1}H-NMR (90 MHz) : δ(ppm)= 6.95 - 6.60 (m, 3H, aromat.), 6.33 (s, 1H, phenol. -OH, D_2O-Austausch), 3.49 (s, 1H, aliphat. -OH, teilw. D_2O-Austausch), 2.86 (d, 2H, -CH-C$\underline{H}_2$-Ar, J = 12 Hz), 2.76 (dt, 2x 2H, -CH_2-C$\underline{H}_2$-N, J = 12 Hz), 2.09 (t, 1H, -CH_2-C$\underline{H}$-N, J = 12 Hz), 1.73 (t, 2H, -N-CH_2-C$\underline{H}_2$-COH, J = 12 HZ), 1.70 (t, 2H, -C-C$\underline{H}_2$-CH_2-N-, J = 12 Hz), 1.42 - 1.29 (m, 1H, -C-C$\underline{H}$-CH_3), 1.26 (s, 6H, -CH_2-COH-(C$\underline{H}_3$)$_2$), 1.24 (s, 3H, -C-CH_3), 0.75 (d, 3H, -CH-C$\underline{H}_3$)

Massenspektrum : m/e(%)= 303(10), 288(6), 230(100), 173(5)
EI, 80 °C

4.3 Hydrolyseversuche zur Spaltung der synthetisierten β-D-Glucuronide

4.3.1 Hydrolysebedingungen

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden Hydrolysen unter den in der Arbeitsgruppe Goenechea üblichen Bedingungen durchgeführt[6-10]. Dabei kamen drei verschiedene Hydrolysebedingungen zur Anwendung (Tab. 16).

Tab. 16: Hydrolysebedingungen für Glucuronide

Methode	Konz. der Hydrolyselsg. an Salzsäure	Hydrolyse Dauer [min]	Hydrolysebedingungen
I	20.0 %	6	offenes Gefäß, Bunsenbrenner
Ia	20.0 %	6	Erlenmeyerkolben mit Rückflußkühler, Heizplatte
II	12.5 %	30	offenes Gefäß, siedendes Wasserbad
IIa	12.5 %	30	Erlenmeyerkolben mit Rückflußkühler, siedendes Wasserbad
III	5.0 %	30	Erlenmeyerkolben mit Rückflußkühler, siedendes Wasserbad

Zusätzlich zu den angegebenen Methoden wurden noch quantitative Bestimmungen nach Hydrolyse in 0 %, 2.5 %, 5 %, 7.5 %, 10 %, 12.5 %, 15 %, 17.5 % und 20 % Salzsäure unter folgenden Hydrolysebedingungen durchgeführt: Hydrolysezeit 30 min und Erhitzen der Hydrolyselösungen in einem Erlenmeyerkolben mit Rückflußkühler im siedenden Wasserbad (Methode IV).

Hydrolyseansätze:

10.0 ml Stammlösung* + 10.0 ml dest. H_2O = 0.0 % HCL
10.0 ml Stammlösung + 10.0 ml 5 % HCL = 2.5 % HCL
10.0 ml Stammlösung + 10.0 ml 10 % HCl = 5.0 % HCl
10.0 ml Stammlösung + 10.0 ml 15 % HCl = 7.5 % HCl
10.0 ml Stammlösung + 10.0 ml 20 % HCl = 10.0 % HCl
10.0 ml Stammlösung + 10.0 ml 25 % HCl = 12.5 % HCl
10.0 ml Stammlösung + 10.0 ml 30 % HCl = 15.0 % HCl
10.0 ml Stammlösung + 10.0 ml 35 % HCl = 17.5 % HCl
10.0 ml Stammlösung + 12.0 ml 37 % HCl = 20.0 % HCl

* Stammlösung = wäßrige Lösungen die zwischen 10 und 30 mg/l des zu bestimmenden Aglykons enthalten.

4.3.2 Eichungen für die quantitativen Bestimmungen

4.3.2.1 Quantitative Bestimmung durch HPLC

Säule : Spherisorb® 5 ODS II (Kontron) 125 X 5 mm

Fließmittel : Methanol, Acetonitril, Wasser (20/20/60)
Geschwindigkeit : 2.0 ml/min (isokratisch)

Detektion : UV-Spektralphotometer (gemessen bei 258 nm)

Probenmenge : 20 µl (Probenschleife)

Retentionszeiten : Benzylalkohol : 2.4 min
2-Phenyl-propan1-ol(1) : 5.1 min

Tab. 17: Meßwerte zur Erstellung der Eichkurve für 2-Phenyl-propan-1-ol(1)
(fünf Einwaagen zu je acht Doppelbestimmungen)

Einwaage [mg]	Volumen [ml]	Konz. [mg/l]	Signalfläche [counts]*	S_{rel} [%]	Steigung [counts·l/mg]
7.7	100	77	33560	6.9	435.8
8.6	50	172	73684	3.0	428.4
7.7	20	385	171030	0.9	444.2
13.8	20	690	297494	1.1	431.2
17.3	20	865	365606	1.4	422.7

* counts = Zähleinheiten des Integrators

Steigung der Geraden:	Standardabweichung der Meßpunkte von der Geraden
$y = a + b \cdot x$	$\overline{\text{counts}\cdot\text{l/mg}} = 432.5$
$b = 425.3$	$S = 8.13$
$a = 1741.8$	$S_{rel} = 1.9\ \%$
$r = 0.9997$	

Tab. 18: Meßwerte zur Erstellung der Eichkurve für Benzylalkohol

(fünf Einwaagen zu je acht Doppelbestimmungen)

Einwaage [mg]	Volumen [ml]	Konz. [mg/l]	Signalfläche [counts]	S_{rel} [%]	Steigung [counts·l/mg]
4.3	100	43	21872	4.3	508.6
6.4	50	128	63081	1.2	492.8
7.1	20	355	178230	1.2	502.1
8.6	20	430	206512	0.7	480.3
25.7	20	1285	617011	0.8	480.2

Steigung der Geraden:	Standardabweichung der Meßpunkte von der Geraden
$y = a + b \cdot x$	$\overline{\text{counts}\cdot\text{l/mg}} = 492.8$
$b = 479.3$	$S = 12.78$
$a = 2084.7$	$S_{rel} = 2.6\ \%$
$r = 0.9999$	

4.3.2.2 Gaschromatographische Bedingungen (Kapillar-GC)

Säule : Borosilikatglas-Kapillarsäule
20 m lang; 0.25 mm innerer Durchmesser;
Filmdicke : 0.30 µm;
Stationäre Phase : SE 54 (Supelco)

Trägergas : Stickstoff

Säulenvordruck : 0.39 - 0.4 bar

Strömungsgeschw.: 20 cm/sec

Injektor : Split (Verhältnis 1/30 bzw. 1/40)

Detektor : FID

Probenmenge : 1 µl

Injektionstemp. : 200 °C

Ofentemp. : 100 °C (isotherm)

Detektortemp. : 200 °C

Retentionsindices nach Kovats[68])

2-Phenyl-propen(21)	:	991
Benzylalkohol	:	1035
2-Phenylpropan2-ol(2)	:	1091
2-Phenylpropan1-ol(1)	:	1169

Tab. 19: Meßwerte zur Erstellung der Eichkurve für
2-Phenyl-propan-1-ol(1) (Split 1/30)
(sieben Einwaagen zu je acht Doppelbestimmungen)

Einwaage [mg]	Volumen [ml]	Konz. [mg/l]	Signalfläche [counts]	S_{rel} [%]	Steigung [counts·l/mg]
4.2	100	42	14280	5.4	340.0
10.3	25	412	138620	2.1	336.5
11.8	20	590	203379	0.5	344.7
23.1	20	1155	406386	0.9	351.8
38.5	20	1925	698092	0.3	362.7
62.8	20	3140	1119008	1.1	356.4
81.3	20	4065	1515115	0.8	372.7

Steigung der Geraden:	Standardabweichung der Meßpunkte von der Geraden
$y = a + b \cdot x$	$\overline{\text{counts·l/mg}} = 351.6$
$b = 368.9$	$S = 12.8$
$a = -10480.5$	$S_{rel} = 3.6\ \%$
$r = 0.9996$	

Tab. 20: Meßwerte zur Erstellung der Eichkurve für Benzylalkohol (Split 1/30)
(sieben Einwaagen zu je acht Doppelbestimmungen)

Einwaage [mg]	Volumen [ml]	Konz. [mg/l]	Signalfläche [counts]	S_{rel} [%]	Steigung [counts·l/mg]
6.5	100	65	22660	1.0	348.6
22.0	25	880	309734	0.9	352.0
23.3	20	1165	409581	1.0	351.6
34.3	20	1715	594930	1.5	346.9
73.9	20	3695	1273050	0.8	344.5
93.2	20	4660	1638510	1.4	351.6
112.8	20	5640	1930457	0.7	342.3

Steigung der Geraden:	Standardabweichung der Meßpunkte von der Geraden
$y = a + b \cdot x$	$\overline{\text{counts·l/mg}} = 347.9$
$b = 345.0$	$S = 4.01$
$a = 3776.0$	$S_{rel} = 1.2\ \%$
$r = 0.9998$	

Tab. 21: Meßwerte zur Erstellung der Eichkurve für
2-Phenyl-propan-2-ol(2) (Split 1/40)
(fünf Einwaagen zu je acht Doppelbestimmungen)

Einwaage [mg]	Volumen [ml]	Konz. [mg/l]	Signalfläche [counts]	S_{rel} [%]	Steigung [counts·l/mg]
13.0	100	130	32137	4.2	247.2
9.7	20	485	124213	2.0	256.1
23.2	20	1160	302458	0.7	260.7
36.3	20	1815	461631	1.0	254.3
53.3	20	2665	709374	0.8	266.2

Steigung der Geraden:	Standardabweichung der Meßpunkte von der Geraden
$y = a + b \cdot x$	$\overline{\text{counts·l/mg}} = 256.6$
$b = 263.9$	$S = 7.1$
$a = -3503.0$	$S_{rel} = 2.75\ \%$
$r = 0.9996$	

Tab. 22: Meßwerte zur Erstellung der Eichkurve für
2-Phenyl-propen(21) (Split 1/40)
(fünf Einwaagen zu je acht Doppelbestimmungen)

Einwaage [mg]	Volumen [ml]	Konz. [mg/l]	Signalfläche [counts]	S_{rel} [%]	Steigung [counts·l/mg]
21.2	100	212	55798	3.2	263.2
12.8	20	640	171136	1.4	267.4
23.7	20	1185	320898	1.0	270.8
34.7	20	1735	479033	0.7	276.1
42.0	20	2100	555030	0.7	264.3

Steigung der Geraden:	Standardabweichung der Meßpunkte von der Geraden
$y = a + b \cdot x$	$\overline{\text{counts·l/mg}} = 268.0$
$b = 269.0$	$S = 5.2$
$a = 393.7$	$S_{rel} = 1.9\ \%$
$r = 0.9995$	

Tab. 23: Meßwerte zur Erstellung der Eichkurve für Benzylalkohol (Split 1/40)
(fünf Einwaagen zu je acht Doppelbestimmungen)

Einwaage [mg]	Volumen [ml]	Konz. [mg/l]	Signalfläche [counts]	S_{rel} [%]	Steigung [counts·l/mg]
10.1	100	101	24967	3.0	247.2
7.3	20	365	88841	1.7	243.4
16.8	20	840	210672	1.2	250.8
101.0	100	1010	249449	0.8	247.0
44.6	20	2230	565082	1.2	253.4

Steigung der Geraden:	Standardabweichung der Meßpunkte von der Geraden
$y = a + b \cdot x$	$\overline{\text{counts·l/mg}} = 248.1$
$b = 253.4$	$S = 3.9$
$a = -2163.9$	$S_{rel} = 1.6\ \%$
$r = 0.9999$	

4.3.2.3 Gaschromatographische Bedingungen zur quantitativen Bestimmung von Pentazocin(3) und "hydroxyliertem Pentazocin"(30)

Säule : gepackte Glassäule
2.0 m lang; 2.0 mm innerer Durchmesser;
Stationäre Phase : 3% SP-2250-DB auf Supelcoport 100/120 mesh

Trägergas : Stickstoff (35 ml/min)

Detektor : FID

Probenmenge : 1 µl

Injektionstemp.: 260 °C

Ofentemp. : 220 °C (isotherm)

Detektortemp. : 260 °C

Retentionsindices nach Kovats[68]

2-Amino-5-chlor-benzophenon	: 2442
Pentazocin(3)	: 2603
hydroxiliertes Pentazocin(30)	: 2763

Tab. 24: Meßwerte zur Erstellung der Eichkurve für Pentazocin(3)
(sechs Einwaagen zu je acht Doppelbestimmungen)

Einwaage [mg]	Volumen [ml]	Konz. [mg/l]	Q_1*	S_{rel} [%]
1.5	100	15	0.0940	36.2
3.6	50	72	1.0465	3.4
8.5	50	170	3.3972	4.6
8.9	20	445	11.2717	4.6
15.7	20	785	21.4679	1.6
24.3	20	1215	35.1449	0.7

* Q_1 = Quotient aus counts(Pentazocin(3))/counts(2-Amino-5-chlor-benzophenon)

Tab. 25: Meßwerte zur Erstellung der Eichkurve für hydroxiliertes Pentazocin(30)
Stammlösung: 14,4 mg/ 20 ml = 720 mg/l

Verdünnung	Konz. [mg/l]	Q_2*	S_{rel} [%]
1/20	36	0.17748	49.5
2/20	72	0.59067	34.5
4/20	144	1.66464	15.4
10/20	360	7.83895	4.4

* Q_2 = Quotient aus counts(hydrox. Pentazocin(30))/counts (2-Amino-5-chlor-benzophenon)

4.3.2.4 Bedingungen zur quantitativen Bestimmung von Pentazocin(3) durch DC-Direktauswertung

Spektralphotometrische Bedingungen:

Lampe	: Quecksilberdampflampe
Anregungswellenlänge	: 366 nm
Kantenfilter	: 400 nm
Monochromatorbandbreite	: 30 nm
Spaltbreite	: 0.7 mm
Spaltlänge	: 7.0 mm

Chromatographische Bedingungen:

Auftragevolumen	: 500 nl (Glaskapillare)
Auftragegerät	: Nanomat von Camag
Fließmittelsystem	: Hexan, Essigester, Ethanol, NH_4OH (25 %) (45+50+5+2) In den Trog wurde zusätzlich ein Glas mit konzentriertem Ammoniak gestellt.
R_f- Werte	: hydroxiliertes Pentazocin(30) 0.34
	Pentazocin(3) 0.67
	2-Amino-5-chlor-benzophenon 0.8
Tauchbad zur Fluoreszenzanregung	: 2.0 ml 1 % $K_3[Fe(CN)_6]$ wurden mit 2.0 ml 4 N-Natronlauge versetzt und mit Wasser/Methanol (20/80) auf 100 ml aufgefüllt. Die Platte wurde nach dem Tauchen 2 h bei 130 °C im Trockenschrank entwickelt.

Tab. 26: Meßwerte zur Erstellung der Eichkurve für Pentazocin(3)
(sechs Einwaagen zu je acht Doppelbestimmungen)

Einwaage [mg]	Volumen [ml]	Konz. [mg/l]	Signalfläche [counts]	S_{rel} [%]
1.5	100	15	41968	6.5
3.6	50	72	215058	8.3
8.5	50	170	504682	7.6
8.9	20	445	1156886	8.7
15.7	20	785	1568998	12.5
24.3	20	1215	2374209	4.5

Tab. 27: Meßwerte zur Erstellung der Eichkurve für hydroxiliertes Pentazocin(30)
Stammlösung: 14,4 mg/ 20 ml = 720 mg/l

Verdünnung	Konz. [mg/l]	Signalfläche [counts]	S_{rel} [%]
1/20	36	121875	13.9
2/20	72	288641	5.9
4/20	144	479050	4.2
10/20	360	1196198	8.9

4.3.3 Aufbereitung der Hydrolysate

4.3.3.1 2-Phenyl-propan-1-β-D-glucopyranuronsäure(16)

Nach Beendigung des Erhitzens wurde das Kondensat im Rückflußkühler mit ca. 25 ml dest. Wasser in die Vorlage gespült. Die Ansätze wurden im Kühlschrank auf + 4°C abgekühlt und anschließend mit Natronlauge neutralisiert (pH-Meter). Bei niedrigen Salzsäurekonzentrationen (≤ 10 %) verwendete man 10 %ige Natronlauge zur Neutralisation (pH 6.5 bis 7.5), bei höheren Konzentrationen wurden erst einige Milliliter konzentrierter Natronlauge unter ständiger Wasserkühlung langsam zugegeben und anschließend wurde die Lösung auf pH 6.5 bis 7.5 eingestellt. Die Extraktion von 2-Phenyl-propan-1-ol(1) aus der wäßrigen Lösung erfolgte mit Baker® Octadecyl (C_{18})- Extraktionssäulen, die vor der Extraktion durch Spülen mit Methanol und Wasser nach Vorschrift des Herstellers aktiviert wurden. Wegen der Flüchtigkeit des Aglykons 1 konnte der Extrakt nicht auf der Säule getrocknet werden. Nach der Extraktion spülte man die Säule mit ca. 5 ml dest. Wasser salzfrei. Für die gaschromatographischen Untersuchungen wurden die Hydrolyseprodukte mit 1.00 ml einer Lösung von 101.0 mg/l Benzyl-alkohol in Chloroform (Interner Standart = IS) und 3 mal mit je 0.2 ml Chloroform von der Säule eluiert. Die Chloroform-Phase wurde nach Trocknen mit Na_2SO_4 , ohne zu filtrieren, gaschromatographisch untersucht. Für die HPLC-Untersuchung wurden die Hydrolyseprodukte mit 1.00 ml IS-Lösung (101.0 mg/l Benzylalkohol in Methanol) und 3 mal mit je 0.2 ml Methanol von der Säule eluiert. Die erhaltene methanolische Lösung wurde untersucht.

4.3.3.2 2-Phenyl-propan-2-ß-D-glucopyranuronsäure(22)

Aufarbeitung wie unter 4.3.3.1 für 2-Phenyl-propan-1-ol(1) beschrieben. Die quantitativen Bestimmungen erfolgten nur durch Kapillar-Gaschromatographie. Bestimmt wurde der Gehalt an 2-Phenyl-propan-2-ol(2) und 2-Phenyl-propen(21).

4.3.3.3 Pentazocin-ß-D-glucopyranuronsäure(6)

Nach Beendigung der Hydrolysezeit wurden die Hydrolysate schnell abgekühlt, wie unter 4.3.3.1 beschrieben mit Natronlauge neutralisiert und mit Pufferlösung auf pH 8.5 eingestellt. Die Hydroly-seprodukte Pentazocin(3) und hydroxyliertes Pentazocin(30) extrahierte man durch dreifaches Ausschütteln der wäßrigen Lösung mit Dichlormethan/Isopropanol (90+10). Die vereinigten Extrakte wurden nach Trocknen mit Na_2SO_4 am Rotationsverdampfer (Wasserbad 40 °C) eingeengt und mit 2 - 3 ml Dichlormethan in ein Schliff-stopfenglas (5 ml) überführt. Nach Abblasen des Dichlormethans mit Stickstoff bei 40 °C im Wasserbad wurden die Proben in 0.50 ml IS-Lösung (45.5 mg/l 2-Amino-5-chlor-benzophenon in $CHCl_3$) gelöst. Die DC-Direktauswertung erfolgte sofort aus dieser Lösung, um Konzentrationsänderungen durch Verdunsten des Lösungsmittels zu vermeiden. Auf die Platte wurden Meßlösungen und Eichlösungen mit ähnlichen Konzentrationen aufgetragen. Die quantitative GC-Bestimmung erfolgte ebenfalls aus dieser Lösung.

4.3.4 Fehlerrechnung und Ergebnisse

4.3.4.1 2-Phenyl-propan-1-ol(1)

Reproduzierbarkeit:

Als Maß für den Zufallsfehler der einzelnen Verfahren wurde die aus n Messungen ermittelte relative Standardabweichung der Meßpunkte von der Eichgeraden genommen.

HPLC:

Der Zufallsfehler für Benzylalkohol (n = 40) betrug $S_{rel.} = 1.9$ % und für 2-Phenyl-propan-1-ol(1) (n = 40) $S_{rel.} = 2.6$ %. Nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz ergab sich daraus eine Gesamtstandardabweichung (= Gesamtzufallsfehler des Verfahrens = S_g) von

$$S_{gHPLC} = \sqrt{2.6^2 + 1.9^2} = 3.22\ \%.$$

In dieser Gesamtstandardabweichung waren Wäge- und Auffüllfehler, sowie gerätebedingte Meßfehler enthalten.

GC:

Für Benzylalkohol (n = 56) wurde ein Zufallsfehler von $S_{rel.} = 1.2$ % und für 2-Phenyl-propan-1-ol(1) (n = 56) ein Wert von 3.6 % ermittelt. Daraus ergab sich eine Gesamtreproduzierbarkeit von

$$S_{gGC} = \sqrt{1.2^2 + 3.6^2} = 3.79\ \%.$$

In dieser Gesamtstandardabweichung waren Wäge- und Auffüllfehler, sowie gerätebedingte Meßfehler enthalten.

Genauigkeit:

Vergleich der Standardabweichungen durch den F-Test

$$F = S_{gGC^2} / S_{gHPLC^2} = 3.79^2 / 3.22^2 = 1.365$$

Der tabellierte theoretische Wert der F-Verteilung für n = 40 und n = 56 beträgt 1.509, so daß sich für diese beiden verwendeten Verfahren bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % keine signifikante Unterschiede ergaben.

t-Test nach Student

Für den t-Test wurden die durch GC und HPLC ermittelten Wiederfindungsraten von 2-Phenyl-propan-1-ol(1) verwendet.
Die Wiederfindungsrate bei der HPLC-Bestimmung betrug 97.1 ± 3.0 % (n = 3) und bei der GC-Bestimmung 100.4 ± 2.1 % (n = 8). In die Formel für den t-Test eingesetzt, ergab sich ein t-Wert von 1.365. Für ein Aussagerisiko von 5 % und 9 Freiheitsgrade fand sich ein tabellierter t-Wert von 2.262. Damit waren Unterschiede zwischen den beiden Mittelwerten nicht nachweisbar. In Tabelle 28 sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen von 2-Phenyl-propan-1-ol(1) und 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16) nach salzsaurer Hydrolyse aufgeführt.

4.3.4.2 2-Phenyl-propan-2-ol(2) und 2-Phenyl-propen(21)

Aus den Eichgeraden wurden die Zufallsfehler für Benzylalkohol (n = 40) mit $S_{rel.}$ = 1.6 %, für 2-Phenyl-propan-2-ol(2) (n = 40) mit $S_{rel.}$ = 2.75 % und für das Artefakt 2-Phenyl-propen(21)

(n = 40) mit $S_{rel.}$ = 1.9 % bestimmt. Als Gesamtreproduzierbarkeit ergab sich daher für die quantitative GC-Bestimmung von 2-Phenyl-propan-2-ol(2) nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz ein Wert von S_g = 3.16 % und für die Bestimmung von 2-Phenyl-propen(21) ein Wert von S_g = 2.48 %. Da das Glucuronid nicht rein dargestellt werden konnte, wurde auf ein zweites Verfahren verzichtet. In Tabelle 29 sind die Ergebnisse der Hydrolyse des Aglykons mit Salzsäure und in Tabelle 30 die Ergebnisse der Hydrolyse des Glucuronides aufgeführt.

4.3.4.3 Pentazocin(3) und hydroxyliertes Pentazocin(30)

Reproduzierbarkeit:

Bei den quantitativen Bestimmungen von Pentazocin(3) und dem hydroxylierten Pentazocin(30) konnten weder für die GC noch für die DC-Direktauswetung Eichgeraden erhalten werden. Daher wurden die Ergebnisse aus Eichkurven ermittelt. Für die Bestimmung des Zufallsfehlers wurde das arithmetische Mittel der Standardabweichungen der einzelnen Meßpunkte verwendet. Aus der Eichkurve von Pentazocin(3) errechnete sich für die GC ein Zufallsfehler von $S_{g_{GC}}$ = 8.5 % (n = 48) und für die DC ein Fehler von $S_{g_{DC}}$ = 8.02 % (n = 48). Für das hydroxylierte Pentazocin(30) wurden für die GC ein Zufallsfehler von $S_{g_{GC}}$ = 25.95 % (n = 32) und für die DC (n = 32) ein Fehler von $S_{g_{DC}}$ = 8.225 % bestimmt. Der Zufallsfehler bei der quantitativen GC setzte sich aus Wäge- und Auffüllfehlern, gerätebedingten Meßfehlern und besonders, bei kleinen Konzentrationen, aus Adsorbtionsvorgängen am Säulenmaterial zu-

sammen. Bei der quantitativen DC-Direktauswertung spielten neben Wäge- und Auffüllfehlern und den gerätebedingten Meßfehlern noch chromatographisch bedingte Fehler (Inhomogenität des DC- Plattenmaterials, kleine Unterschiede in der Laufhöhe, Randeffekte, u.s.w) und Auftragefehler eine Rolle.

Genauigkeit:

Der Vergleich der ermittelten Gesamtstandardabweichungen für Pentazocin(3) durch den F-Test ergab einen Wert von 1.124. Der tabellierte theoretische Wert der F-Verteilung für n_{DC} = 48 und n_{GC} = 48 beträgt ~ 1.389, so daß zwischen den Ergebnissen der beiden Verfahren bei einer 5 %igen Irrtumswahrscheinlichkeit kein signifikanter Unterschied bestand. Für das hydroxylierte Pentazocin(30) errechnete sich ein Wert von 9.95. Dieses Ergebnis zeigte, daß die DC-Direktauswertung für die quantitative Bestimmung des hydroxylierten Pentazocins das geeignetere Verfahren darstellte.

Für den t-Test wurden die durch GC und DC-Direktauswertung bestimmten Wiederfindungsraten von Pentazocin(3) verwendet. Die Wiederfindungsrate für die GC betrug 94.1 ± 2.6 % und für die DC 95.6 ± 7.3 %. Daraus ergab sich ein t-Wert von 1.304. Für ein Aussagerisiko von 5 % und 9 Freiheitsgrade fand sich ein tabellierter t-Wert von 2.262. Damit waren Unterschiede zwischen den beiden Mittelwerten nicht nachweisbar.

In Tabelle 31 sind die Ergebnisse der Hydrolyse des Aglykons mit Salzsäure und in Tabelle 32 die Ergebnisse der Hydrolyse des Glucuronides aufgeführt.

Tab. 28: Ergebnisse der Hydrolyse von 2-Phenyl-propan-1-ol(1) und 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)

		Hydrolyse 2-Phenyl-propan-1-ol(1)				Hydrolyse 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)			
Methode	HCl [%]	Einwaage 1 [mg/l]	n	Wiederfindung 1 [mg/l]	Wiederfindung 1 [%]	Einwaage 16 [mg/l]	n	Wiederfindung 1 [mg/l]	Wiederfindung 1 [%]
GC	0.0*	13.6	8	13.7 ± 0.3	100.4 ± 2.1	57.6	8	0.0	0.0
HPLC	0.0*	28.0	3	27.2 ± 0.9	97.1 ± 3.0	47.6	3	0.0	0.0
HPLC	0.0	28.0	3	26.4 ± 0.8	94.3 ± 2.9	47.6	3	1.8 ± 0.6	8.6 ± 2.9
HPLC	2.5	28.0	3	27.8 ± 0.5	99.4 ± 1.9	47.6	3	4.9 ± 1.5	23.7 ± 7.2
HPLC	5.0	28.0	3	26.9 ± 1.5	96.1 ± 5.4	47.6	3	11.9 ± 2.1	57.3 ± 10.3
GC	5.0	12.2	8	11.6 ± 1.2	95.1 ±10.2	57.6	8	16.5 ± 1.5	65.7 ± 6.0
HPLC	7.5	28.0	3	25.9 ± 1.3	92.4 ± 4.6	47.6	3	17.6 ± 1.3	84.6 ± 6.2
HPLC	10.0	28.0	3	25.0 ± 1.3	89.2 ± 4.7	47.6	3	21.0 ± 1.8	101.2 ± 8.9
HPLC	12.5	28.0	3	24.3 ± 1.0	86.3 ± 3.6	47.6	3	21.4 ± 1.6	103.3 ± 7.6
GC	12.5	12.2	9	11.5 ± 0.6	94.3 ± 4.8	57.6	8	23.9 ± 1.4	94.9 ± 5.5
HPLC	15.0	28.0	3	24.8 ± 1.4	88.5 ± 4.9	47.6	3	21.3 ± 1.7	102.5 ± 8.0
HPLC	17.5	28.0	3	24.3 ± 1.1	86.8 ± 4.0	47.6	3	22.5 ± 0.4	108.4 ± 1.9
HPLC	20.0	28.0	3	25.2 ± 0.7	92.5 ± 2.7	47.6	3	21.7 ± 0.6	104.8 ± 3.0
GC	20.0**	13.6	8	13.3 ± 0.7	88.0 ± 4.9	57.6	12	21.8 ± 1.2	86.8 ± 4.6

*Wiederfindugsraten des Extraktionsverfahrens

**Hydrolyse nach Methode Ia (6 min, Heizplatte)

Tab. 29: Ergebnisse der Hydrolyse von 2-Phenyl-propan-2-ol(2)
Bestimmungsmethode: Kapillar-GC

Einwaage 2 [mg/l]	n	HCl [%]	Wiederfindung 2 [mg/l]	Wiederfindung 2 [%]	Ausbeute 21* [mg/l]	Ausbeute 21* [%]	2 + 21* [mg/l]	2 + 21* [%]
20.2	8	---	18.7 ± 0.9	92.4 ± 4.6	----	----	18.7 ± 0.9	92.4 ± 4.6
36.2	4	---	36.4 ± 0.8	100.5 ± 2.1	----	----	36.4 ± 0.8	100.5 ± 2.1
20.2	3	0.0	19.3 ± 2.3	95.4 ± 11.6	----	----	19.3 ± 2.3	95.4 ± 11.6
20.2	3	1.0	8.6 ± 0.1	42.6 ± 0.7	3.3 ± 0.1	16.7 ± 0.4	11.9 ± 0.1	59.3 ± 0.8
20.2	3	2.0	8.3 ± 0.4	41.0 ± 1.9	3.0 ± 0.1	14.7 ± 0.4	11.3 ± 0.4	55.7 ± 1.9
20.2	3	2.5	7.8 ± 0.2	38.8 ± 0.8	4.1 ± 0.8	20.4 ± 3.8	11.9 ± 0.8	59.2 ± 3.9
20.2	3	3.0	8.4 ± 0.6	41.6 ± 2.9	3.1 ± 0.1	15.7 ± 0.2	11.5 ± 0.6	57.3 ± 2.9
20.2	3	4.0	7.7 ± 0.1	38.1 ± 0.3	2.9 ± 0.4	14.5 ± 2.1	10.6 ± 0.4	52.6 ± 2.1
20.2	3	5.0	7.3 ± 0.7	36.2 ± 3.6	2.8 ± 0.4	13.7 ± 1.9	10.1 ± 0.8	49.9 ± 4.1
36.2	8	5.0	12.4 ± 1.4	34.4 ± 3.9	5.2 ± 0.5	14.3 ± 1.3	17.6 ± 1.5	48.7 ± 4.1
20.2	3	7.5	8.2 ± 0.4	40.8 ± 2.0	2.4 ± 0.2	11.9 ± 0.8	10.6 ± 0.5	52.7 ± 2.2
20.2	3	10.0	7.7 ± 1.2	38.3 ± 5.8	2.2 ± 0.2	10.8 ± 0.9	9.9 ± 1.2	49.1 ± 5.9
20.2	3	12.5	9.3 ± 0.9	45.8 ± 4.4	2.0 ± 0.1	9.8 ± 0.4	11.3 ± 0.9	55.6 ± 4.4
36.2	8	12.5	15.7 ± 1.2	43.5 ± 3.2	2.1 ± 0.3	5.8 ± 0.7	17.8 ± 1.2	49.3 ± 3.3
20.2	3	15.0	9.2 ± 0.8	45.5 ± 3.9	1.7 ± 0.1	8.5 ± 0.7	10.9 ± 0.8	54.0 ± 4.0
20.2	3	17.5	9.9 ± 0.4	48.9 ± 2.2	1.5 ± 0.1	7.6 ± 0.6	11.4 ± 0.4	56.5 ± 2.3
20.2	3	20.0	9.8 ± 0.4	48.5 ± 2.1	1.3 ± 0.1	6.1 ± 0.2	11.1 ± 0.4	54.6 ± 2.1
36.2	8	20.0**	15.5 ± 1.2	42.7 ± 3.4	2.1 ± 0.3	5.6 ± 0.8	17.5 ± 1.2	48.3 ± 3.5

* Ausbeute an dem Artefakt 2-Phenyl-propen(21), berechnet als 2

**Methode Ia

Tab. 30 : Ergebnisse der Hydrolyse von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)
Einwaage : 40.8 mg/l 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)
Bestimmungsmethode: Kapillar-GC

n	HCl [%]	Wiederfindung 2 [mg/l]	Wiederfindung 2 [%]	Ausbeute 21* [mg/l]	Ausbeute 21* [%]	Gesamt 2 + 21* [mg/l]	Gesamt 2 + 21 [%]
3	---	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	1.0	4.4 ± 0.2	24.8 ± 1.1	2.3 ± 0.1	12.7 ± 0.4	6.7 ± 0.2	37.6 ± 1.1
3	2.0	4.2 ± 0.1	23.7 ± 0.4	2.3 ± 0.2	12.7 ± 0.9	6.5 ± 0.2	36.4 ± 1.0
3	2.5	4.2 ± 0.2	23.4 ± 1.4	1.6 ± 0.1	9.3 ± 0.4	5.8 ± 0.2	32.7 ± 1.5
3	3.0	4.3 ± 0.2	24.0 ± 1.0	2.3 ± 0.1	12.9 ± 0.7	6.6 ± 0.2	36.9 ± 1.2
3	4.0	4.3 ± 0.1	23.9 ± 0.8	2.0 ± 0.2	11.1 ± 0.8	6.3 ± 0.2	35.0 ± 1.1
8	5.0	4.2 ± 0.5	23.4 ± 2.9	1.8 ± 0.2	10.1 ± 1.0	6.0 ± 0.5	33.5 ± 3.1
3	7.5	4.6 ± 0.1	27.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1	8.1 ± 0.2	6.1 ± 0.1	35.7 ± 0.2
3	10.0	4.2 ± 0.1	23.8 ± 0.4	1.3 ± 0.1	7.3 ± 0.2	5.5 ± 0.1	31.1 ± 0.5
8	12.5	4.8 ± 0.2	26.8 ± 1.0	1.3 ± 0.1	6.8 ± 0.2	6.1 ± 0.2	33.6 ± 1.0
3	15.0	4.2 ± 0.3	23.3 ± 1.5	< 1	5	5.2 ± 0.3	28.3 ± 1.5
3	17.5	4.4 ± 0.1	24.7 ± 0.2	< 1	5	5.4 ± 0.1	29.7 ± 0.2
3	20.0	4.8 ± 0.1	26.8 ± 0.1	< 1	5	5.8 ± 0.1	31.8 ± 0.1
8	20.0**	4.7 ± 0.1	26.5 ± 0.2	< 1	5	5.7 ± 0.1	31.5 ± 0.2

*Ausbeute an dem Artefakt 2-Phenyl-propen(21), berechnet als 2

**Methode Ia

Tab. 31: Ergebnisse der Hydrolyse von Pentazocin(3)
Einwaage : 20.8 mg/l

Methode	n	HCl [%]	Wiederfindung 3 [mg/l]	Wiederfindung 3 [%]	Ausbeute 30* [mg/l]	Ausbeute 30* [%]	Gesamt 3 + 30* [mg/l]	Gesamt 3 + 30* [%]
GC	3	---	19.6 ± 0.5	94.1 ± 2.6	0.0	0.0	19.6 ± 0.5	94.1 ± 2.6
DC	8	---	19.9 ± 1.5	95.6 ± 7.3	0.0	0.0	19.9 ± 1.5	95.6 ± 7.3
GC	3	0.0	18.5 ± 0.3	89.0 ± 1.2	0.0	0.0	18.5 ± 0.3	89.0 ± 1.2
DC	8	0.0	19.9 ± 1.0	95.8 ± 4.9	Spur	Spur	19.9 ± 1.0	95.8 ± 4.9
GC	3	2.5	16.1 ± 0.2	77.4 ± 1.0	1.8 ± 0.3	8.5 ± 1.4	17.9 ± 0.4	85.9 ± 1.7
DC	8	2.5	18.9 ± 1.9	90.8 ± 8.9	1.0 ± 0.2	4.8 ± 1.1	19.9 ± 1.9	95.6 ± 9.0
GC	3	5.0	14.1 ± 1.3	67.9 ± 6.3	4.2 ± 0.2	20.2 ± 0.9	18.3 ± 1.3	88.1 ± 6.4
DC	8	5.0	16.3 ± 1.6	78.4 ± 7.5	4.6 ± 0.7	21.9 ± 3.6	20.9 ± 1.8	100.3 ± 8.3
GC	3	7.5	8.6 ± 0.5	41.1 ± 2.4	9.9 ± 0.4	47.7 ± 1.9	18.5 ± 0.6	88.8 ± 3.1
DC	8	7.5	11.7 ± 1.7	56.5 ± 8.0	9.5 ± 1.2	45.4 ± 5.8	21.2 ± 2.1	101.9 ± 9.9
GC	3	10.0	4.4 ± 0.4	20.9 ± 2.1	14.1 ± 2.7	67.5 ±12.6	18.5 ± 2.7	88.4 ±12.8
DC	8	10.0	6.5 ± 1.3	31.1 ± 6.1	12.1 ± 1.7	58.0 ± 8.1	18.6 ± 2.1	89.1 ±10.1
GC	3	12.5	3.0 ± 0.3	14.4 ± 1.4	13.9 ± 0.5	66.8 ± 2.2	16.8 ± 0.6	81.2 ± 2.6
DC	8	12.5	3.2 ± 0.9	15.6 ± 3.9	13.0 ± 1.8	62.8 ± 8.5	16.2 ± 2.0	78.4 ± 9.4
GC	3	15.0	3.1 ± 0.2	15.1 ± 1.1	13.1 ± 0.9	63.1 ± 4.2	16.2 ± 0.9	78.2 ± 4.3
DC	8	15.0	3.3 ± 0.5	15.8 ± 2.3	15.0 ± 0.8	72.0 ± 4.1	18.3 ± 0.9	87.8 ± 4.7
GC	3	17.5	2.9 ± 0.3	13.7 ± 1.4	13.2 ± 1.5	63.7 ± 7.4	16.1 ± 1.5	77.4 ± 7.5
DC	8	17.5	3.0 ± 0.4	14.3 ± 1.8	15.4 ± 2.6	73.7 ±12.3	18.4 ± 2.6	88.0 ±12.4
GC	3	20.0	2.2 ± 0.2	10.6 ± 1.1	11.5 ± 1.5	55.2 ± 7.0	13.7 ± 1.5	65.8 ± 7.1
DC	8	20.0	2.6 ± 0.5	12.5 ± 2.4	13.9 ± 1.0	66.6 ± 5.0	16.5 ± 1.1	79.1 ± 5.5
DC	8	20.0**	3.0 ± 1.0	14.4 ± 4.7	13.5 ± 1.2	65.0 ± 6.0	16.5 ± 1.6	79.4 ± 7.6

* Ausbeute an dem Artefakt hydroxiliertes Pentazocin(30), als 3 berechnet

**Methode Ia

Tab. 32: Ergebnisse der Hydrolyse von Pentazocin-glucuronid(6)
Einwaage : 32.8 mg/l Pentazocin-glucuronid(3)

Methode	n	HCl [%]	Wiederfindung 3 [mg/l]	Wiederfindung 3 [%]	Ausbeute 30* [mg/l]	Ausbeute 30* [%]	Gesamt 3 + 30* [mg/l]	Gesamt 3 + 30* [%]
GC	3	---	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
DC	8	---	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
GC	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
DC	8	0.0	0.0	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0
GC	3	2.5	2.7 ± 0.2	13.3 ± 1.0	Spur	Spur	2.7 ± 0.2	13.3 ± 1.0
DC	8	2.5	3.5 ± 0.2	17.1 ± 0.9	Spur	Spur	3.5 ± 0.2	17.1 ± 0.9
GC	3	5.0	4.5 ± 0.6	22.4 ± 3.0	2.4 ± 0.5	11.8 ± 2.5	6.9 ± 0.8	34.2 ± 3.8
DC	8	5.0	6.4 ± 1.7	31.4 ± 8.2	1.9 ± 0.6	9.4 ± 3.1	8.3 ± 1.8	40.8 ± 8.8
GC	3	7.5	4.9 ± 0.1	24.0 ± 0.3	8.2 ± 2.8	40.3 ±13.7	13.1 ± 2.8	64.3 ± 13.7
DC	8	7.5	7.0 ± 0.8	34.5 ± 4.1	7.1 ± 0.7	35.0 ± 3.4	14.1 ± 1.1	69.5 ± 5.3
GC	3	10.0	3.5 ± 1.0	17.3 ± 4.9	10.9 ± 0.4	53.4 ± 1.9	14.4 ± 1.1	70.7 ± 5.3
DC	8	10.0	3.3 ± 1.2	16.4 ± 6.0	11.3 ± 1.9	55.9 ± 9.4	14.6 ± 2.2	72.3 ± 11.2
GC	3	12.5	2.4 ± 0.1	11.8 ± 0.6	13.9 ± 1.1	67.9 ± 5.3	16.3 ± 1.1	79.7 ± 5.3
DC	8	12.5	2.1 ± 0.7	10.1 ± 3.4	14.0 ± 1.4	68.9 ± 6.9	16.1 ± 1.6	79.0 ± 7.7
GC	3	15.0	2.7 ± 0.1	13.1 ± 0.6	16.1 ± 0.4	79.6 ± 2.2	18.8 ± 0.4	92.7 ± 2.3
DC	8	15.0	2.5 ± 0.4	12.2 ± 1.9	15.2 ± 0.9	74.9 ± 4.2	17.7 ± 1.0	87.1 ± 4.6
GC	3	17.5	2.6 ± 0.1	12.8 ± 0.6	15.4 ± 0.3	75.8 ± 1.5	18.0 ± 0.3	88.6 ± 1.6
DC	8	17.5	2.4 ± 0.2	11.8 ± 1.1	15.6 ± 1.5	76.7 ± 7.3	18.0 ± 1.5	88.5 ± 7.4
GC	3	20.0	2.2 ± 0.2	11.0 ± 1.0	14.7 ± 0.1	72.4 ± 0.3	16.9 ± 0.2	83.4 ± 1.0
DC	8	20.0	2.1 ± 0.8	10.2 ± 3.8	15.4 ± 3.4	75.9 ±16.8	17.5 ± 3.5	86.1 ± 17.2
DC	8	20.0**	3.1 ± 1.3	15.2 ± 6.5	12.9 ± 2.1	63.8 ±10.6	16.0 ± 2.5	79.0 ± 12.4

* Ausbeute an dem Artefakt hydroxiliertes Pentazocin(30), berechnet als 3

**Methode Ia

4.4 Bestimmung der Halbwertszeit der β- Glucuronidasespaltung

Versuchsbedingungen:

Die Bestimmung erfolgte mittels HPLC.

Säule : Lichrosorb® RP_{18} 125x5 mm (E. Merck,Darmstadt)

Detektion : UV-Spektrometer

(gemessen bei λ_{max} der Verbindungen)

Fließmittel : 0.2 M-KH_2PO_4/CH_3CN (85 + 15)

Geschwindigkeit: 2 ml/min

Probenmenge : 20 µl (Probenschleife)

	Retentionszeiten [min]	
	Glucuronid	Aglykon
p-Nitrophenol-glucuronid(26)*	1.8	6.2
2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)	2.0	10.2
2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)	2.1	12.8
Pentazocin-glucuronid(6)	2.2	20 - 30

* Fließmittel: 90+10; Geschwindigkeit: 1 ml/min

Die Glucuronide wurden in Acetatpufferlösung, die mit konz. H_3PO_4 auf pH 5.5 eingestellt war, gelöst und bei 37 °C inkubiert.

Einwaagen:

26: 3.0 mg/10 ml, davon 5.0 ml + 2.4 mg β-Glucuronidase

16: 2.4 mg/10 ml, davon 5.0 ml + 2.3 mg β-Glucuronidase

22: 2.2 mg/10 ml, davon 5.0 ml + 2.5 mg β-Glucuronidase

6: 2.8 mg/10 ml, davon 5.0 ml + 2.6 mg β-Glucuronidase

Tab. 33: Spaltung von p-Nitrophenol-glucuronid(26) mit β-Glucuronidase

t [min]	c [%]	log c
18	92.1	1.9642
35	90.4	1.9562
51	84.4	1.9266
71	77.7	1.8904
88	71.4	1.8537
120	59.3	1.7731
138	54.2	1.7340
158	42.0	1.6233
174	40.7	1.6096
191	32.7	1.5152
208	30.1	1.4786
224	25.2	1.4014
241	23.5	1.3711
302	14.6	1.1654
363	8.5	0.9310
415	4.8	0.6848
541	2.4	0.3820

$\log c_{(t_0)} = 2.1003$

$b = -0.003159$

$r = 0.994$

$k = 7.32 \cdot 10^{-3}\ min^{-1}$

$t_{\frac{1}{2}} = 94.8\ min$

Tab. 34: Spaltung von 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16) mit β-Glucuronidase

t [min]	c [%]	log c
38	95.6	1.98046
87	90.9	1.95856
1008	35.0	1.54410
1049	34.1	1.53275
1233	30.8	1.48855
1435	21.2	1.32634
2470	7.7	0.88649
2522	7.5	0.87506
2667	5.7	0.75587
2859	4.2	0.62325

$\log c_{(t_0)} = 2.01086$

$b = -0.000465$

$r = 0.998$

$k = 1.12 \cdot 10^{-3}\ min^{-1}$

$t_{\frac{1}{2}} = 620.1\ min$

Tab. 35: Spaltung von 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22)

a) mit β-Glucuronidase

t [h]	c [%]	log c
0	100.0	2.0000
24	88.9	1.9489
48	78.8	1.8965
96	67.5	1.8293

$\log c_{(t_0)} = 1.993$

$b = -0.00177$

$r = 0.993$

$k = 3.93 \cdot 10^{-3}\ h^{-1}$

$t_{\frac{1}{2}} = 176.5\ h$

b) ohne β-Glucuronidase

t [h]	c [%]	log c
0	100.0	2.0000
24	88.9	1.9489
48	78.6	1.8954
96	67.9	1.8319

$\log c_{(t_0)}$ = 1.992
b = - 0.000174
r = 0.991
k = $3.84 \cdot 10^{-3}$ h^{-1}
$t_{\frac{1}{2}}$ = 180.5 h

Tab. 36: Spaltung von Pentazocin-glucuronid(6) mit β-Glucuronidase

t [h]	c [%]	log c
2	96.3	1.9836
4	93.1	1.9689
24	62.6	1.7966
27	59.4	1.7738
32	54.1	1.7332
50	42.8	1.6314

$\log c_{(t_0)}$ = 1.968
b = - 0.00618
r = 0.992
k = $15.5 \cdot 10^{-3}$ h^{-1}
$t_{\frac{1}{2}}$ = 44.7 h

4.5 Extraktionsraten der Glucuronide 16 und 6

UV-Messung im Maximum

2 ml Probelösung mit 0.1 ml Wasser, 0.1 ml 0.1 N-HCl oder 0.1 N-NaOH wurden mit 1 ml Lösungsmittel extrahiert; paralell dazu wurde eine entsprechende wäßrige Lösung als Vergleich extrahiert.

Tab. 37: Meßergebnisse zur Untersuchung der Extraktionsraten von 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16)

Lösungsmittel	Dichlormethan/ Isopropanol(3+1)		Ether		Dichlormethan	
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher
Extinktion (Wasser)	0.635	0.42	0.635	0.43	0.635	0.475
Extraktion(%)	33.9		32.3		25.2	
Extinktion (0.1 N-HCl)	0.60	0.39	0.625	0.44	0.60	0.47
Extraktion(%)	35.0		29.6		21.7	
Extinktion (0.1 N-NaOH)	0.57	0.40	0.57	0.41	0.57	0.40
Extraktion(%)	29.8		28.1		29.8	

Eine Probe mit 0.1 N-HCl wurde 3 mal mit Dichlormethan/ Isopropanol(3+1) extrahiert:

Anfangsextinktion: 0.56

30.3 %

1. Extraktion : 0.39

28.2 %

2. Extraktion : 0.28

35.7 %

3. Extraktion : 0.18

Tab. 38: Meßergebnisse zur Untersuchung der Extraktionsraten von Pentazocin-glucuronid(6)

Lösungsmittel	Dichlormethan/ Isopropanol(3+1)		Ether		Dichlormethan	
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher
Extinktion (Wasser)	0.885	0.78	0.885	0.77	0.885	0.78
Extraktion(%)	11.9		13.0		11.9	
Extinktion (0.1 N-HCl)	0.88	0.76	0.88	0.83	----	----
Extraktion(%)	13.6		5.7		----	
Extinktion (0.1 N-NaOH)	0.95	0.94	0.85	0.75	----	----
Extraktion(%)	1.1		11.8		----	
Extinktion (pH 8.5)	0.87	0.75	0.87	0.76	----	----
Extraktion(%)	13.8		12.6		----	

4.6 Mathematische Formeln

Statistik

Mittelwert = $\bar{x}$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

x_i = Werte der Einzelbestimmungen

n = Anzahl der Meßwerte

Standardabweichung = S

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})}{(n - 1)}}$$

relative Standardabweichung = $S_{rel.}$

$$S_{rel.} = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}} \quad [\%]$$

Fehlerfortpflanzungsgesetz

$$S_g = \sqrt{S_a^2 + S_b^2}$$

S_g = Gesamtstandardabweichung

S_a = Standardabweichung Substanz a

S_b = Standardabweichung Substanz b

F-Test

Vergleich zweier Standardabweichungen, der Unterschied ist signifikant, wenn gilt:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \geq F = f(P, f_1, f_2)$$

F = tabellierter Wert, der vom Aussagerisiko (P) und den Freiheitsgraden f_1, f_2 der Bestimmungen abhängig ist ($f_1 = n_1 - 1$; $f_2 = n_2 - 1$)

t-Test (nach Student)

Vergleich zweier Mittelwerte

$$t = |(x_1 - x_2)| \cdot \sqrt{\frac{n_1 + n_2 - 2}{n_1 + n_2} - \frac{n_1 \cdot n_2}{S_1^2(n_1 - 1) + S_2^2(n_2 - 1)}}$$

t = tabellierter Wert, der vom Aussagerisiko (P) und der Zahl der Freiheitsgrade (f) abhängig ist ($f = n_1 + n_2 - 2$)

Regressionsrechnung

für Eichkurven : x = mg/l

y = counts oder Q_1 bzw. Q_2

für β-Glucuronidasespaltung: x = t [min oder h]

y = log c

Definition einer Geraden

$$y = a + b \cdot x$$

Steigung der Geraden

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})}$$

Schnittpunkt der Geraden mit der y - Achse

$$a = \bar{y} - b \cdot x$$

Korrelationskoeffizient

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2}}$$

Geschwindigkeitskonstante

$$k = \frac{2.303}{t} \cdot \log \frac{c(t_o)}{c(t)}$$

Halbwertszeit

$$t_{\frac{1}{2}} = \ln 2 / k$$

5 Zusammenfassung

Durch die große Vielzahl der potentiell toxischen Verbindungen die in der forensischen Analytik eine Rolle spielen ist es schwierig, diese und ihre Metaboliten gezielt zu charakterisieren und zu quantifizieren, da zu Beginn der Untersuchung des biologischen Materials meist nicht bekannt ist, um welche Verbindung es sich handelt. Die Untersuchung von biologischem Material erfolgt daher meist durch allgemeine Screening-Untersuchungen. Wichtiger Schritt bei diesen Untersuchungen ist die hydrolytische Spaltung von Konjugaten durch Mineralsäuren. Die einzelnen empirischen Methoden, die in der Literatur genannt werden, unterscheiden sich in der Dauer der Hydrolyse (15 Sekunden bis 3 Stunden), der Säurekonzentration (2 % Salzsäure bis 33 % Schwefelsäure) und der Reaktionstemperatur (siedendes Wasserbad, Bunsenbrenner, Autoklav). Da mit so unterschiedlichen Hydrolysebedingungen keine vergleichbaren Ergebnisse erhalten werden können, sollten die Hydrolyseraten von Glucuroniden für drei in der Routineanalytik übliche Methoden quantitativ bestimmt werden.

Zur Untersuchung der Stabilität der glykosidischen Bindung sollten die Glucuronide eines primären, tertiären und phenolischen Alkohols, des 2-Phenyl-propanols(1), 2-Phenyl-propan-2-ols(2) und Pentazocins(3) dargestellt werden. Durch Kombination verschiedener Literaturvorschriften konnten die Glucuronide von 1 und 3 mit Ausbeuten von ca. 35 % synthetisiert werden. Da es nicht gelungen ist, die Verbindungen durch Kristallisation zu reinigen, mußte nach einer Möglichkeit gesucht werden, störende

Nebenbestandteile quantitativ zu entfernen. Die dünnschichtchromatographische Reinigung lieferte Produkte, die in ihren Elementaranalysen stark von den theoretischen Werten abwichen. Als Ursache konnte die Bildung von Natriumsalzen mit einem Verhältnis von ca. 1.5 Mol Natrium pro Mol Glucuronid ermittelt werden. Die Natriumionen stammten offenbar aus dem Schichtmaterial der verwendeten DC-Platten. Die Abtrennung gelang mit Hilfe von Kationenaustauschern, hatte aber den Nachteil, daß wegen der Acidität des verwendeten Ionenaustauschers Teile der Glucuronide hydrolysiert wurden und daher eine weitere Reinigung notwendig war. Als bessere Methode erwies sich die Fällung der Glucuronide als Bleisalze, die dann mit bidestilliertem Wasser/Ethanol (1+1) salzfrei gewaschen werden konnten. Durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in eine methanolische Aufschlämmung der Bleiglucuronate konnten die Glucuronide in reiner Form erhalten werden.

Die Synthese des Glucuronides des tertiären Alkohols gelang wegen der Säurelabilität des Aglykons nicht. 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) wurde daher als Metabolit aus Mäuseurin angereichert. Eine vollständige Reinigung war nicht möglich, da sich das Glucuronid in weitaus stärkerem Maße als das Aglykon 2 selbst als säure- und thermolabile Substanz erwies. Im Zusammenhang mit den Tierversuchen ist bemerkenswert, daß sowohl bei der Gabe von 2 als auch bei der Gabe von Cumol(4) 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) als einziger Metabolit im Mäuseurin nachweisbar war.

Die Untersuchung der hydrolytischen Spaltung der Glucuronide lieferte sehr unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Hydrolyseraten, der Wiederfindung der Aglyka und der Artefaktbildung.

Untersucht wurden Spaltungen der glykosidischen Bindung, die nach Methode I in 20 % HCl (6 min; Heizplatte; offenes Gefäß bzw. Rückflußkühlung(Ia)), nach Methode II in 12.5 % HCl (30 min; siedendes Wasserbad; offenes Gefäß bzw. Rückflußkühlung(IIa)) und nach Methode III in 5 % HCl (30 min; siedendes Wasserbad; Rückflußkühlung) durchgeführt wurden (vgl. Kap. 2.4.1). Die Abhängigkeit der Hydrolyseraten von der Hydrolysedauer wurde nicht untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, daß 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) schon unter den Bedingungen der Methode III, 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16) mit Methode IIa und Pentazocin-glucuronid(6) erst mit Methode I quantitativ gespalten werden. Zur Abschätzung der zur quantitativen Spaltung notwendigen minimalen Salzsäurekonzentration wurden Hydrolysen mit Salzsäurekonzentrationen zwischen 0 % und 20 % (30 min; siedendes Wasserbad, Rückflußkühlung) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen gelang die quantitative Spaltung von 22 mit einer Salzsäurekonzentration von 1 %, von 16 mit 9 bis 10 % HCl und von 6 mit 14 bis 15 % HCl.

Entsprechend dem für die acidolytische Spaltung von Glucuroniden angenommenen A-1-Mechanismus, für den je nach Aglykon zwei Reaktionsmechanismen für primäre, sekundäre und phenolische Substituenten sowie für tertiäre Substituenten formuliert werden, wurde das Verhalten der Glucuronide interpretiert.

Demnach sollte Pentazocin-glucuronid(6) nach dem Mechanismus für phenolische Glucuronide reagieren und benötigt drastische Hydrolysebedingungen. 2-Phenyl-propan-2-glucuronid(22) reagiert nach dem Mechanismus für tertiäre Alkohole und wird schon durch milde Hydrolysebedingungen quantitativ gespalten. Die Hydrolyse von 2-Phenyl-propan-1-glucuronid(16) kann sowohl nach dem für primäre Substituenten formulierten als auch nach dem zweiten Mechanismus reagieren. Diese Reaktion wird offensichtlich durch Nachbargruppeneffekte unter Bildung eines Phenoniumkations möglich. Dies führt zu einer anchimeren Beschleunigung der Reaktion und erklärt die für einen primären Substituenten relativ leichte Hydrolysierbarkeit.

Neben einer hohen Hydrolyserate wird für qualitative und quantitative Bestimmungen in der forensischen Analytik bei der hydrolytischen Spaltung von Glucuroniden auch eine maximale Wiederfindungsrate der freigesetzten Aglyka angestrebt.

Da sich 2-Phenyl-propan-1-ol(1) bei den Untersuchungen als säurestabile Substanz erwies, konnten auch unter drastischen Hydrolysebedingungen nach der Hydrolyse von 16 hohe Wiederfindungsraten des Aglykons von über 85 % erhalten werden. Die Wiederfindungsraten des Aglykons 2-Phenyl-propan-2-ol(2) lagen nach Hydrolyse von 22 unter milden Hydrolysebedingungen bei ca. 40 % und nahmen bei Steigerung der Salzsäurekonzentration leicht zu. Bei der hydrolytischen Spaltung von 6 konnten nach Hydrolyse in 5 bis 7.5 % HCl maximale Wiederfindungsraten für Pentazocin(3) bestimmt werden, obwohl unter diesen Bedingungen erst 30 bis 40 % des Glucuronides gespalten sind. Eine Erhöhung der Salzsäurekonzentration führt zu Wiederfindungsraten, die zwischen 10 und 15 % liegen.

Die Verluste von ca. 50 bis 60 % bei der Hydrolyse von 22 und von 85 bis 90 % bei der Hydrolyse von 6 werden durch Artefaktbildung bzw. durch weitere Abbaureaktionen der Aglyka bewirkt. Die säurekatalysierte Dehydratisierung von 2 liefert bei der Behandlung des Aglykons 2 und des Glucuronides 22 mit Salzsäure das Artefakt 2-Phenyl-propen(21), das durch weitere Reaktionen eine Vielzahl von Artefakten geringer Ausbeute bilden kann, von denen ca. 30 gaschromatographisch detektiert werden konnten. Wegen der stark ausgeprägten Artefaktbildung wurden die quantitativen Bestimmungen auf 2 und 21 beschränkt. Unter diesen Bedingungen konnten ca. 50 bis 55 % der eingesetzten Substanzmenge quantitativ erfaßt werden. Bei der Behandlung des Aglykons 3 und des Glucuronides 6 mit Salzsäure erhält man durch säurekatalysierte Hydroxylierung der Dimethylallyl-Seitenkette das Artefakt hydroxyliertes Pentazocin(30). Die Ausbeute an 30 nimmt mit Steigerung der Salzsäurekonzentration zu und erreicht 70 bis 75 % bei Salzsäurekonzentrationen über 12.5%. Bei der quantitativen Bestimmung von 3 und 30 können insgesamt 80 bis 90 % der eingesetzten Substanzmenge erfaßt werden.

Das unterschiedliche Verhalten der drei untersuchten Glucuronide und deren Aglyka macht deutlich, daß es sehr schwierig ist, eine für verschiedene Glucuronide gleichermaßen gut geeignete Hydrolysemethode zu empfehlen. Außerdem ist anzunehmen, daß bei der hydrolytischen Spaltung von Glucuroniden noch andere, als die für die drei Glucuronide beschriebenen Reaktionen möglich sind, die die Hydrolyseraten, die Wiederfindungsraten und die Artefaktbildung beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Sabino Goenechea am Institut für Rechtsmedizin und von Herrn Prof. Dr. Gerhard Rücker am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. S. Goenechea danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und die Überlassung eines Arbeitsplatzes sowie für seine stete Förderung und seine hilfreiche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. G. Rücker danke ich herzlich für das Interesse am Thema dieser Arbeit, für seine wertvollen Ratschläge und zahlreichen Anregungen.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises Prof. Dr. G. Rücker möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und konstruktiven Anregungen danken.

Besonders möchte ich mich bei den Assistenten Dr. K.-J. Goebel, Dr. H. Brzezinka und Dr. G. Hoffmann des Institutes für Rechtsmedizin für ihr stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. F. Köhler am Institut für Humangenetik, mit dessen Hilfe ich die für meine Arbeit wichtigen Tierversuche durchführen konnte.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Melzer und den Mitarbeitern der Abteilung Produkt-Marketing der Firma CPT Text-Computer GmbH in Köln-Porz bedanken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit auf modernen Textverarbeitungsgeräten zu schreiben.

Herzlicher Dank gebührt schließlich allen, die mir während meiner Dissertation bereitwillig aufschlußreiche Informationen und Unterlagen zur Verfügung stellten.

LEBENSLAUF

Geburtstag, Geburtsort	: 15.07.1954 in Porz-Wahn
Familienstand	: seit dem 02.11.1979 mit Beate Langer, geb. Hopp, verheiratet
1961 - 1965	ev. Volksschule in Porz
1965 - 1973	mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in Porz
1973 - 1975	Zeitsoldat bei der Bundeswehr
1975 - 1981	01.04.1975 Immatrikulation an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn im Fach Lebensmittelchemie 20.11.1978 Diplomchemiker-Vorprüfung 01.12.1978 bis 31.05.1980 Praktikum am Chemischen- und Lebensmittel-Untersuchungsamt in Eschweiler 23.01.1981 Lebensmittelchemiker-Hauptprüfung
1981 - 1985	01.03.1981 Beginn der Promotion am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn in der Abteilung für forensisch-toxikologische Analytik März 1981 bis Mai 1981 Fortgeschrittenen-Praktikum im Arbeitskreis Prof. Dr. G. Rücker am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn 17.10.83 bis 30.09.84 Wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut